Aus dem Institut für Anatomie
(Geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. Hans-Georg Baumgarten
Arbeitsgruppe: Professor Dr. Hans-Dieter Gatzke)
des Fachbereiches Natur- und sozialwissenschaftliche
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie
der Freien Universität Berlin

Quantitative histologische Untersuchungen am Thalamus von Hamstern nach Infektion mit dem Scrapie-Agens

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Gregor Pleger
aus
Berlin

1995

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0005

Aus dem Institut für Anatomie
(Geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. Hans-Georg Baumgarten
Arbeitsgruppe: Professor Dr. Hans-Dieter Gatzke)
des Fachbereiches Natur- und sozialwissenschaftliche
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie
der Freien Universität Berlin

Quantitative histologische Untersuchungen am Thalamus von Hamstern nach Infektion mit dem Scrapie-Agens

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Gregor Pleger
aus
Berlin

Referent: Professor Dr. Hans-Dieter Gatzke

Korreferent: Professor Dr. Milan Pospišil

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 27.06.1985

Meinen Eltern als Dank gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
	Abkürzungsverzeichnis	9
1.	EINLEITUNG	10
2.	ALLGEMEINE ÜBERSICHT	11
2.1.	Geschichte der Erkrankung, Symptome	11
2.1.1.	Histologische Veränderungen im ZNS	12
2.1.2.	Übertragung	13
2.2.	Das Konzept der "Slow-Virus-Infections" (SVI)	15
2.2.1.	Krankheitsformen des ZNS infolge SVI	16
2.2.2.	Charakteristika der "Slow"-Viren	18
2.2.3.	Bedeutung der SVI für die Humanmedizin	19
2.3.	Das Scrapie-Agens	21
2.3.1.	Physiko-chemische Eigenschaften	21
2.3.2.	Reinigung und Charakterisierung	22
2.3.3.	Vermehrung des Agens in vitro	24
2.3.4.	Immunologische Untersuchungen	24
2.4.	Pathogenese	25
2.4.1.	Die Bedeutung des LRS	26
2.4.2.	Beeinflussende Faktoren für die Inkubationszeit	26
2.4.3.	Ausbreitung des Scrapie-Agens	28

Seite

3.	FRAGESTELLUNG	30
4.	MATERIAL UND METHODEN	31
4.1.	Durchführung der Tierversuche und Erstellung der histologischen Präparate	31
4.2.	Histologische Kriterien	32
4.3.	Auswertung der Fotografien	34
4.3.1.	Das Auswertesystem	35
4.3.2.	Zellzählung	35
4.3.3.	Messung der Zellkerngrößen	38
4.3.4.	Korrekturverfahren	39
5.	ERGEBNISSE	41
5.1.	Zellzählung	41
5.1.1.	Gliazellkerne der Gruppe 1	42
5.1.2.	Gliazellkerne der Gruppe 2	48
5.1.3.	Neurone	54
5.2.	Zellkerngröße	59
5.2.1.	Gliazellkerne der Gruppe 1	59
5.2.2.	Gliazellkerne der Gruppe 2	61
5.2.3.	Neurone	62
5.3.	Flächen-Formfaktoren	64
5.4.	Korrekturverfahren	65
5.5.	Kerndichte der Gesamtglia	67

		Seite
6.	DISKUSSION	68
7.	ZUSAMMENFASSUNG	72
8.	ANHANG	73
9.	LITERATURVERZEICHNIS	108

Benutzte Abkürzungen

CJD	=	Creutzfeldt-Jakob-Disease
h.p.l.c.	=	high-pressure liquid chromatography
i.c.	=	intrazerebral
i.b.	=	intrabulbär
i.p.	=	intraperitoneal
i.v.	=	intravenös
LRS	=	Lymphoretikuläres System
MS	=	Multiple Sklerose (Enzephalomyelitis disseminata)
p.i.	=	post infectionem
PML	=	Progressive multifokale Leukoenzephalopathie
SAF	=	Scrapie-Associated-Fibres
s.c.	=	subcutan
SDAT	=	Senile Dementia of the Alzheimer Type
SSPE	=	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
SVI	=	Slow-Virus-Infections
TME	=	Enzephalopathie des Nerzes
ZNS	=	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Scrapie ist eine chronisch degenerative infektiöse Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie gilt als Prototyp der subakuten spongioformen Enzephalopathien, wurde zum ersten Mal 1732 in England erwähnt und von COMBER 1772 in dem Aufsatz "Real Improvements in Agriculture" beschrieben. In der Natur tritt sie bei Schafen und Ziegen auf. In den letzten Jahren gelang auch die experimentelle Übertragung auf Mäuse, Ratten und Goldhamster, was bezüglich der geringeren Inkubationszeit bei diesen Labortieren von Bedeutung ist. Über Struktur und Vermehrungsmechanismus des Erregers ist noch weniges bekannt. Als vermeintliche Erreger kommen bisher in Frage: Polysaccharide (ADAMS et al., 1968), Viroide (DIENER, 1972), sich selbst replizierende Membranen (GIBBONS et al., 1966), infektiöse Proteine ohne eigene Nukleinsäure [(sog. "Prions") PRUSINER, 1982a], sowie die sog. Virinos (DICKINSON et al., 1979), bei denen es sich um Fremdnukleinsäuren handelt, die mit Wirtsproteinen assoziiert sind. Auch die Pathogenese der Erkrankung ist noch nicht geklärt. Es konnten an infizierten Tieren weder Zellen gefunden werden, die das Agens replizieren, noch gelang es bisher, eindeutig den Ausbreitungsweg des Erregers im Organismus zu verfolgen.

Auf der Suche nach dem Erreger ist man in jüngster Vergangenheit einen entscheidenden Schritt vorangekommen. MERZ und DIRINGER fanden unabhängig voneinander fibrilläre Strukturen an Scrapie-infiziertem Gewebe (MERZ et al., 1981; DIRINGER et al., 1983b) sowie an Gehirnen von Tieren, die mit der Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung infiziert waren (MERZ et al., 1983). Jedoch ist bis heute noch nicht geklärt, ob diese Fibrillen die

Scrapie-auslösenden Organismen selbst darstellen oder pathologische Nebenprodukte der Erkrankung sind. Möglich ist auch, daß die Fibrillen sekundäre oder tertiäre Zusammenlagerungen von Elementarbausteinen darstellen, wobei diese Elementarbausteine die Erreger sind. Das Fibrillenkonzentrat ist infektiös.

Daß die Scrapie-Krankheit nicht nur für die Veterinärmedizin von Bedeutung ist, zeigt die Tatsache, daß gewisse Erkrankungen des Menschen, nämlich Kuru und die Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung, ähnliche Erscheinungsbilder im Gehirn aufweisen wie Scrapie (GAJDUSEK et al., 1967; GIBBS et al., 1968). Darüber hinaus wird eine enge Beziehung zwischen dem Erreger der Scrapie-Krankheit und noch nicht nachgewiesenen Erregern von Enzephalopathien beim Menschen, wie z.B. der Enzephalomyelitis disseminata (Multiple Sklerose = MS) und dem Morbus Alzheimer, angenommen (TER MEULEN, 1975).

2. Allgemeine Übersicht

2.1. Geschichte der Erkrankung, Symptome

Das Krankheitsbild der Scrapie-Erkrankung ist seit über 200 Jahren bekannt (COMBER, 1772) und wurde schon in vielen Gegenden der Welt mit Schafhaltung beobachtet. Klinisch zeigt es sich als subakute oder chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems. Das stark anhaltende Hautjucken (Pruritus), unter dem infizierte Tiere zu leiden haben, gab der Erkrankung ihren Namen: "to scrape" = kratzen. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigen die Tiere Gangstörungen, Tremor, Übererregbar-

keit und Gewichtsverlust. Fieber tritt nicht auf. Entzündungszeichen sind nicht nachweisbar. Im Liquor ist weder eine Pleozytose noch eine Proteinverschiebung festzustellen.

Die Erkrankungszeit ist protrahiert: Der Zeitraum zwischen Beginn der ersten klinischen Symptome und dem Exitus letalis ist bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich lang: beim Schaf 4 - 9 Monate (BECK et al., 1964), bei der Ziege 3 - 4 Monate (HADLOW, 1961) und beim Hamster 11 - 12,5 Wochen (HOGAN et al., 1981; PRUSINER et al., 1980). In den meisten Fällen führt Scrapie zum Tod der befallenen Tiere.

2.1.1. Histologische Veränderungen im ZNS

Histopathologische Untersuchungen zeigen degenerative Veränderungen, die überwiegend auf das ZNS beschränkt sind (BECK et al., 1964). In der Literatur wurden an einzelnen Spezies und in einzelnen Gebieten des Gehirns eine progressive neuronale Degeneration, ein Status spongiosus und eine Hypertrophie glialer Elemente mit ausgedehnter Astrozytose in der grauen Substanz und in den subkortikalen Hirnzellen beschrieben (PALMER, 1957; HADLOW, 1961; PATTISON et al., 1963; FIELD et al., 1964; BECK et al., 1964; LAMPERT et al., 1971; BARINGER et al., 1979). Ebenso verhält es sich mit den Nervenzellen, für welche eine Chromatolyse, Pyknose und Homogenisierung des Zytoplasmas mit Bildung von Vakuolen beschrieben wurde (HOLMAN et al., 1943; ZLOTNIK et al., 1957). Dabei soll die Vakuolenbildung von Bedeutung sein, da sie die Diagnose der Scrapie-Erkrankung ermögliche (ZLOTNIK et al., 1957; BARINGER et al., 1979; DICKINSON et al., 1983; CARP et al., 1984).

2.1.2. Übertragung

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß Scrapie übertragbar ist und somit von einem sich vermehrenden Erreger hervorgerufen sein muß (CULLÉ et al., 1936), begann man sich mehr und mehr mit dieser Erkrankung zu beschäftigen. Der genaue Infektionsweg ist noch nicht geklärt, jedoch erfolgt die natürliche Übertragung wahrscheinlich durch direkten Schleimhautkontakt (BROTHERSTON et al., 1968). In einigen Fällen konnte beobachtet werden, daß neugeborene Schafe Scrapie-erkrankter Muttertiere schon infiziert waren. Daher soll eine intrauterine Infektion für die Erkrankung eine gewisse Rolle spielen (GAJDUSEK et al., 1968; STAMP, 1968).

Da nicht alle Schafe erkranken, wurde eine genetische Resistenz bzw. Empfänglichkeit für diese Infektion angenommen. Vermutet wurde ein die Erkrankung kontrollierendes autosomales, rezessives Gen (DICKINSON et al., 1968a; DICKINSON et al., 1969).

Trotz des vermeintlich genetischen Einflusses läßt sich Scrapie experimentell auf eine Vielzahl von unterschiedlichen und nicht miteinander verwandten Tierspezies übertragen (PATTISON, 1965). So gelang es im Jahre 1961, Scrapie auf die Maus zu übertragen (CHANDLER, 1961 und 1963), später auch auf den Hamster (ZLOTNIK et al., 1965). Die Inkubationszeit, die bei Übertragung von Schaf zu Schaf 5 - 75 Monate (WILSON et al., 1950) und von Ziege zu Ziege 6 - 13 Monate (PATTISON, 1965) dauert, verringert sich bei Übertragung von Ratte zu Ratte auf 5 - 6 Monate (PATTISON, 1965), von Maus zu Maus auf 3 - 8 Monate (CHANDLER, 1961 und 1963; PATTISON et al., 1963;) und von Hamster zu Hamster gar auf 2 - 3 Monate (HOGAN et al., 1981).

Die experimentelle Transmission gelingt intrazerebral (z.B. HADLOW, 1961; CHANDLER, 1961; PATTISON, 1965), subcutan (KIMBERLIN et al., 1978), intrabulbär (BUYUK-MIHCI et al., 1983), intraperitoneal und intravenös (EHLERS et al., 1984). Das Scrapie-Agens läßt sich nach intraperitonealer Inokulation im ZNS schon nachweisen, bevor klinische oder neuropathologische Veränderungen erkennbar sind (KIMBERLIN et al., 1982).

Die wichtigsten klinischen Zeichen bei der intrazerebralen Übertragung auf Hamster sind (HOGAN et al., 1981): 60 Tage post infectionem (p.i.) Tremor und rasche Kopfbewegungen nach entsprechender Stimulation, z.B. Berührung des Tieres mit einem stumpfen oder spitzen Gegenstand von außen. 1 - 10 % der Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkt ein generalisiertes Krampfverhalten. 63 Tage p.i. werden die Tiere ataktisch, die Reflexe sind langsam, der Tremor wird intensiver und ruckartige Kopfbewegungen sind auffallend. 70 Tage p.i. werden die Bewegungen immer langsamer, die Tiere sind so ataktisch, daß sie Schwierigkeiten haben, ihre Balance zu halten. Hinzu kommen Gewichtsabnahme und eine kyphotische Haltung. 80 Tage p.i. sind viele Tiere schon tot, die noch leben, sind unfähig zu stehen und reagieren auf Reizung mit krampfhaften Bewegungen ihrer Glieder.

Nach intraperitonealer Übertragung treten erst nach 70 - 80 Tagen p.i. die ersten Verdachtszeichen einer Erkrankung auf. Die Tiere reagieren auf Berührung schreckhaft und halten die Ordnung in ihrem Nestbau nicht mehr ein. 90 Tage p.i. sind 30% der Hamster erkrankt. Die Tiere zeigen ein aggressives Verhalten, gehen unkoordiniert, und ein Tremor mit wackelnden Kopfbewegungen ist zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt kann die Scrapie-Diagnose sicher gestellt werden. Um den 100. Tag p.i. werden die Scrapie-Symptome immer

drastischer sichtbar. Schließlich tritt 120-150 Tage p.i. der Exitus letalis ein (DIRINGER, 1984).

2.2. Das Konzept der "Slow-Virus-Infections" (SVI)

Slow-Virus-Infektionen (SVI) des ZNS stellen Krankheitsgruppen dar, die erstmals in der Tiermedizin beobachtet wurden. 1954 prägte SIGURDSSON aufgrund experimenteller Untersuchungen an Schafen in Island den Begriff der "langsamen" Virusinfektion. Seit 1935 beobachtete man unter isländischen Schafen das Auftreten einer zentralnervösen Erkrankung, die immer tödlich verlief. Diese Erkrankung mit dem Namen Scrapie oder Rida war von Karakul-Schafen, die auf einer deutschen Farm in Halle an der Saale gezüchtet worden waren, nach Island eingeschleppt worden. Bei Transmissionsversuchen von Hirnsuspensionen erkrankter Schafe auf gesunde Tiere machte SIGURDSSON folgende charakteristische Beobachtungen:

1. Die Inkubationszeit betrug Monate bis Jahre.
2. Nach Auftreten der klinischen Symptome setzte ein protrahierter Krankheitsverlauf ein, der immer zum Exitus letalis führte.
3. Die Infektion war auf eine Spezies und ein Organ bzw. Gewebesystem begrenzt.

Bis auf Punkt 3 haben sich diese Kriterien, mit denen SIGURDSSON die SVI definiert, generell als korrekt erwiesen. Jedoch zeigten spätere Untersuchungen, daß die Spezies-Spezifität nicht zutreffend ist, da die experimentelle Übertragung von Scrapie auf verschiedene La-

bortiere möglich ist. Seine experimentellen Studien gaben den Anlaß, chronisch entzündliche und chronisch degenerative zentralnervöse Erkrankungen bei Tier und Mensch auf eine mögliche Slow-Virus-Ätiologie zu untersuchen. Besonders die Beobachtung einer jahrelangen Inkubationszeit war Voraussetzung für die Einordnung menschlicher ZNS-Erkrankungen als SVI.

2.2.1. Krankheitsformen des ZNS infolge SVI

HADLOW wies im Jahre 1959 bereits auf Ähnlichkeiten von histopathologischen Veränderungen zwischen der Kuru-Krankheit des Menschen und der Scrapie-Erkrankung des Schafes hin. 1967 gelang dann die erfolgreiche Übertragung von Kuru auf den Schimpansen (GAJDUSEK et al., 1967). Ein Jahr später konnten experimentelle Transmissionsversuche der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung des Menschen (CJD) auf Schimpansen erfolgreich durchgeführt werden (GIBBS et al., 1968). Somit waren folgende acht Erkrankungen ursächlich auf SVI zurückzuführen: Scrapie, Maedi, Visna, infektiöse Adenomatose des Schafes, Aleuten-Krankheit des Nerzes, übertragbare Enzephalopathie des Nerzes (TMEC), Kuru, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Tabelle 1 faßt die Erkrankungen zusammen, die bei Tier und Mensch als SVI angesehen werden. Aufgrund neuropathologischer und virologischer Merkmale unterscheidet man zwei Gruppen von Erkrankungen, die subakuten spongioformen Enzephalopathien und die subakuten chronischen Enzephalomyelitiden (GAJDUSEK et al., 1968).

Tab. 1 Slow-Virus-Infektionen des ZNS

Gruppe	Tierreich	Mensch	Neuropatholog. Veränderung	Erreger
Subakute Enzephalopathien	1. Scrapie 2. Enzephalopathie des Nerzes (TME)	1. Kuru 2. Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung	Degeneration	Unkonventionelle Virustypen
Subakute Enzephalomyelitiden	1. Visna 2. Maedi 3. infekt. Adenomatose des Schafes	1. Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) 2. Progressive multifokale Leukoenzephalopathie (PML)	Entzündung	Konventionelle Virustypen

in Anlehnung an GAJDUSEK et al., 1968

2.2.2. Charakteristika der "Slow"-Viren

Virologische Befunde bei den spongioformen Enzephalopathien und subakuten Enzephalomyelitiden lassen zwei grundverschiedene Erregergruppen erkennen, die als unkonventionelle und konventionelle Viren bezeichnet werden können (GAJDUSEK et al., 1973). Tabelle 2 gibt deren Eigenschaften wieder:

Tab. 2 Eigenschaften der unkonventionellen und konventionellen Virustypen bei Slow-Virus-Infektionen des ZNS

Unkonventionelle Virustypen	Konventionelle Virustypen
1. Fehlender Nachweis von intra- u. extrazellulären Virionen. Infektiosität scheint membrangebunden zu sein.	1. Nachweis von Standard-Virusstrukturen intra- u. extrazellulär
2. Kein Hinweis auf das Vorliegen von Nukleinsäure-Genomen	2. Nukleinsäure-Genome. Virusmultiplikation wird gehemmt durch Nukleinsäureinhibitoren
3. Bislang kein Nachweis von Antigenen oder einer Immunantwort des Wirtes auf die Infektion.	3. Unauffällige antigene Eigenschaften
4. Ungewöhnliche Resistenz gegenüber Temperatur, UV-, Röntgenstrahlen u. chem. Einflüssen	4. Physikalische Stabilität in Abhängigkeit der entsprechenden Virusgruppe
5. Induzierung einer Erkrankung, die nur auf das ZNS beschränkt ist.	5. Pathologische Veränderungen auch außerhalb des ZNS.

nach TER MEULEN, 1975

Es ist auffallend, daß die Charakterisierung der unkonventionellen Virustypen nur durch einen "Negativ-Kata-

log" gelingt. Die bisher vorliegenden Untersuchungen ermöglichen noch keine einheitlichen Vorstellungen über Struktur, biochemische Zusammensetzung, Antigenität und Replikationsverhalten, obwohl für einzelne Erreger (z.B. Scrapie) die Arbeiten so weit gediehen sind, daß nur noch der direkte Erregernachweis fehlt. Bei den meisten Erregern sind bis jetzt nur Infektiosität, die bisher empfänglichen Tier-Spezies und die klinischen und neurologischen Veränderungen, die durch diese Virustypen hervorgerufen werden, bekannt.

Dagegen zeigen konventionelle Virustypen ein bekanntes Verhalten in ihren physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse weisen darauf hin, daß es eigentlich keine "langsamen" Viren gibt, sondern daß nur der Krankheitsprozeß langsam verläuft.

2.2.3. Bedeutung der SVI für die Humanmedizin

Die genannten menschlichen SVI stellen seltene Erkrankungen dar bzw. haben für den mitteleuropäischen Bereich keine Bedeutung. So trat Kuru nur bei einem Eingeborenenstamm in Neuguinea auf. Die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung kommt äußerst selten vor und befällt Frauen und Männer im Alter von 35 bis 65 Jahren. Aufgrund des gehäuften Auftretens in einigen Familien wird ätiologisch, ähnlich wie bei Scrapie, ein Zusammentreffen zwischen dem Erreger und einem genetischen Defekt angenommen, der durch ein dominantes autosomales Gen übertragen werden soll. Auch die subakute sklerosierende Panenzephalitis stellt mit einem statistischen Krankheitsbefall von 1 auf 1 Million Einwohner ein seltenes

Leiden dar und ist nur bei Kindern und Jugendlichen zu beobachten. Die progressive multifokale Leukoenzephalopathie tritt normalerweise als seltene Komplikation im Verlauf eines lymphoproliferativen Geschehens auf, wie z.B. beim Morbus Hodgkin.

Jedoch bieten die genannten Erkrankungen von klinischer und virologischer Seite aus interessante Aspekte, da durch die experimentellen Übertragungen menschlicher spongioformer Enzephalopathien auf Schimpansen (GAJDUSEK et al., 1966) auch andere subakute und chronisch degenerative Erkrankungen des ZNS als mögliche SVI angesehen werden können. Dies war auch vor einigen Jahren ein gewichtiger Ansatz für erneute Untersuchungen über den Morbus Alzheimer (Senile Dementia of the Alzheimer Type = SDAT) und die Enzephalomyelitis disseminata (Multiple Sklerose). Erste vorliegende Ergebnisse unterstützen dabei eine Virus-Ätiologie der Enzephalomyelitis disseminata (PRINEAS, 1972; TER MEULEN et al., 1972; IWASAKI et al., 1973; UTERMOHLEN et al., 1973), wobei das Masernvirus und ein Parainfluenza-Typ 1-Virus (6/94-Virus) eine Rolle spielen könnten. Da für den Morbus Alzheimer und die Enzephalomyelitis disseminata kein anderes geeignetes Tiermodell zur Verfügung steht, erscheint es sehr sinnvoll, sich mit den "Slow-Virus-Infections", insbesondere mit der Scrapie-Erkrankung, auseinanderzusetzen, seitdem es gelungen ist, mit der Übertragung auf Hamster und Mäuse ein geeignetes Tiermodell zu finden.

2.3. Das Scrapie-Agens

Mehrere grundlegende Arbeiten aus neuerer Zeit haben eine große Anzahl von Informationen über die Eigenschaften des Scrapie-Agens geliefert (PRUSINER et al., 1981; MERZ et al., 1981; PRUSINER et al., 1982a; DIRINGER et al., 1983b, c; TERRY, 1983; MARSH et al., 1984). Dies ist von um so größerer Bedeutung, da der direkte Erregernachweis bisher fehlt.

2.3.1. Physiko-chemische Eigenschaften

Anhand von Tabelle 3 ist ersichtlich, daß das Scrapie-Agens gegenüber einer Reihe herkömmlicher Desinfektions- und Inaktivierungsmethoden stabil ist:

Tab. 3 Scrapie-Agens

stabil	instabil
Trockene (160° C) und feuchte (80° C) Hitze	Harnstoff
Formaldehyd	Perjodat
PH 2 - 8	Chloramin-T
Salzlösungen	Phenol
Methanol und Äthanol	Chloräthanol
Detergentien (außer: SDS)	
hohe Dosen ultravioletter (254 nm) und ionisierender Strahlung (KIMBERLIN, 1976; HUNTER, 1979; LATARJET, 1979)	

Die Größe des Scrapie-Genoms wurde durch Inaktivierungsversuche mit γ-Strahlung auf 150.000 D geschätzt (ALPER et al., 1966; LATARJET, 1979). Die Größe des Agens selbst setzte man nach Filtrationsexperimenten auf 30 -50 nm an (KIMBERLIN et al., 1971).

2.3.2. Reinigung und Charakterisierung

Infolge der Hydrophobie des Agens (PRUSINER et al., 1981) ist es nicht leicht, das Scrapie-Agens aus Gewebehomogenaten zu reinigen und zu konzentrieren. Eine Reinigung kann immer nur nach dem Kriterium der Infektiosität durchgeführt werden. So muß nach jeder Reinigung erneut ein Tierversuch gemacht werden, um sicher zu sein, daß das gereinigte Agens immer noch infektiös ist. Die Reinigung in bezug auf Protein konnte bis jetzt 100 - 1000-fach erfolgen (PRUSINER et al., 1982b; DIRINGER et al., 1983a).

Bei der Reinigung und Konzentrierung des Scrapie-Agens aus Hamstergehirnen konnte ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 27.000 D gefunden werden. Dieses Protein war in Gehirnen gesunder Hamster nicht nachweisbar (PRUSINER et al., 1982a). Ein ähnliches Protein, das elektronenmikroskopisch Partikel mit fibrillärer Struktur und vermutlich segmentaler Untergliederung aufweist, konnte kürzlich nachgewiesen werden (DIRINGER et al., 1983b). Über diese Fibrillen hatten auch schon MERZ et al., 1981, berichtet. Jedoch ist es bisher noch fraglich, ob selbstständige Untereinheiten existieren, und diese Untereinheiten den eigentlichen Erreger darstellen, oder ob erst die Zusammenlagerung der Untereinheiten zu Fibrillen schließlich den

Erreger bilden. In diesem Zusammenhang wird auch diskutiert, welche Beziehung zwischen dem Scrapie-Agens und amyloiden Plaques bestehen, die gelegentlich bei scrapiekranken Tieren gefunden werden (WISNIEWSKI et al, 1975).

Die Größe des Scrapie-Agens wurde mittels "high-pressure liquid chromatography" (h. p. 1. c) auf kleiner 50.000 D bestimmt (PRUSINER, 1982a). Dies hätte zur Folge, daß es sich aufgrund der geringen Größe auf keinen Fall um einen konventionellen Virustypen handeln kann. Dieser Wert muß jedoch in Frage gestellt werden, da DIRINGER bei einer Wiederholung des Experimentes feststellte, daß die h.p.l.c. durch eine Absorptionschromatographie überlagert worden war (DIRINGER et al., 1983c).

Bisher konnte ein Nachweis der Anwesenheit einer Nukleinsäure als Bestandteil des Scrapie-Agens nicht erbracht werden.

Aufgrund der Tatsache, daß zwei Arbeitsgruppen (MERZ und DIRINGER) unabhängig voneinander im Transmissions-Elektronenmikroskop fibrilläre Strukturen fanden (Scrapie-Associated-Fibres = SAF), scheint der direkte Erregernachweis nun in greifbare Nähe gerückt zu sein (MERZ et al., 1981; DIRINGER et al., 1983b).

Dies kann für den Erregernachweis des Morbus Alzheimer (SDAT) von Bedeutung sein, da die Erkrankung ebenso wie Scrapie zu den SVI gehört, und einige neurohistopathologische Befunde Ähnlichkeiten mit denen Scrapie-erkrankter Tiere aufweisen (TERRY, 1983).

2.3.3. Vermehrung des Agens in vitro

Bislang konnte noch kein Gewebekultursystem geschaffen werden, in welchem das Scrapie-Agens zu solch hohen Titern vermehrt werden konnte, wie man sie aus infiziertem Gehirn Scrapie-erkrankter Tiere erhält. Wegen Einzelheiten vgl. die Arbeiten von CLARKE et al., 1967 und 1970; CLARKE, 1979; ASHER et al., 1979.

2.3.4. Immunologische Untersuchungen

Trotz einer Vielzahl von Versuchen gelang es bisher nicht, Antikörper gegen das Scrapie-Agens zu finden. Getestet wurden Antiseren von Schafen, Ziegen, Mäusen, Hamstern, Kaninchen, Affen und Menschen (KASPER et al., 1981). Die humorale Immunantwort Scrapie-infizierter Mäuse gegen Schaferythrozyten ist nicht verändert (CLARKE, 1968).

Das Verhalten des zellulären Immunsystems wurde erst später untersucht. Die funktionelle Kapazität der zellulären Immunität wurde mit Milzzellen Scrapie-infizierter Mäuse in der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLR) getestet. Dabei gelang es jedoch nicht, Zellveränderungen festzustellen oder auf den Zelloberflächen ein Scrapie-spezifisches Antigen nachzuweisen (KIMBERLIN et al., 1975). Jedoch konnte das äußerst seltene Auftreten von schwachen perivasculären Infiltraten in Gehirnen Scrapie-erkrankter Mäuse demonstriert werden (MUSETEANU et al., 1981).

Darüber hinaus konnten auch Autoantikörper gegen ein Neurofilamentprotein in den Seren von Tieren gefunden werden, die mit Scrapie, Kuru oder CJD infiziert waren (AOKI et al., 1982).

Auch Interferon bietet keinen Schutz gegen die Scrapie-Erkrankung. Es wird weder durch das Scrapie-Agens induziert, noch beeinflußt das Agens selbst die durch Inducer stimulierte Produktion des Interferons (FIELD et al., 1969; WORTHINGTON, 1972).

Die experimentelle Herstellung von Antikörpern gegen den Erreger ist bisher noch nicht gelungen.

2.4. Pathogenese

Eine der ersten breitangelegten quantitativen Studien über die Pathogenese der Scrapie-Erkrankung bei Mäusen wurde 1967 von EKLUND vorgelegt. Er stellte fest, daß das Scrapie-Agens nach peripherer Infektion schnell zu hohen Titern in der Milz und in den Lymphknoten, später auch in der Glandula submandibularis zu finden war. Dagegen konnte ein Titeranstieg im Gehirn viel später, nämlich erst nach ca. 100 Tagen post infectionem, allerdings mit höherem Niveau als in der Peripherie, nachgewiesen werden.

2.4.1. Die Bedeutung des Lymphoretikulären Systems (LRS)

Bevor die Replikation des Agens im ZNS beginnt, ist eine wesentlich schnellere Vermehrung in der Peripherie, und zwar im LRS, festzustellen. Wird die Infektion intrazerebral gesetzt, beginnt die Replikation im ZNS sofort. Der extraneurale Titeranstieg des Agens spielt für den Ablauf der Erkrankung vermutlich nur noch eine untergeordnete Rolle. Bei der peripheren Infektion kommt wahrscheinlich der Replikation des Agens im LRS eine große Bedeutung zu, da möglicherweise pathogenetische und zeitliche Zusammenhänge zwischen dem Befall von Milz und Lymphknoten einerseits und den pathologischen und funktionellen Veränderungen im ZNS andererseits bestehen (FRASER et al., 1978; KIMBERLIN et al., 1979).

2.4.2. Beeinflussende Faktoren für die Inkubationszeit

Insgesamt gibt es fünf wesentliche Faktoren, die Einfluß auf die Inkubationszeit bei einer Scrapie-Infektion haben:

1. Agensdosis
   Agensdosis und Inkubationszeit verhalten sich zueinander reziprok, d.h. mit fallender Dosis verlängert sich die Inkubationszeit (KIMBERLIN et al., 1978).

2. Infektionsroute
   Wird der Titer eines Scrapie-Inokulums nach intrazerebraler, intravenöser, intraperitonealer oder

subcutaner Infektion bestimmt, ist nach intrazerebraler Infektion der höchste und nach subcutaner Infektion der niedrigste Titer festzustellen (KIMBERLIN et al., 1978). Es verändert sich also die Inkubationszeit nach Infektion mit einer definierten Agens-Dosis je nach dem Infektionsmodus.

3. Zustand des LRS

Genetisch bedingte oder chirurgisch erzeugte Asplenie verlängert die Inkubationszeit nach extraneuraler Infektion (FRASER et al., 1970 und 1978; CLARKE et al., 1971). Keine Beeinflussung auf den infektiösen Verlauf üben Cyclophosphamid-Behandlung (WORTHINGTON et al., 1971) und Ganzkörperbestrahlung (MC FARLIN et al., 1971) aus. Dagegen verlängert eine Steroidbehandlung nach peripherer Infektion die Inkubationszeit und gibt Tieren eine Überlebenschance (OUTRAM et al., 1974).

Wird das Immunsystem von Mäusen mit dem Mitogen Phytohaemagglutinin stimuliert, kommt es zu einer erhöhten Empfänglichkeit für das Scrapie-Agens (DICKINSON et al., 1978). Bei Immunostimulation mit BCG (Bacillus Calmette Guérin) wird die Inkubationszeit bei peripherer Inokulation von Mäusen und Hamstern verkürzt (KIMBERLIN et al., 1978).

1984 wurde mit Dextransulfat 500 eine Substanz beschrieben, die nach einmaliger Applikation auch nach erfolgter Infektion zu einer Suppression der Scrapie-Erkrankung in vitro führte (EHLERS et al., 1984). Ob diese Substanz jedoch auch in vivo wirksam und für prophylaktische Maßnahmen von Bedeutung sein könnte, ist Gegenstand laufender Untersuchungen (EHLERS, 1984).

4. Genotyp des Wirtes
   Ein die Inkubationszeit kontrollierendes nicht dominantes Gen konnte identifiziert werden: sinc-Gen (scrapie incubation time) mit den Allelen s7 (to shorten) und p7 (to prolong) (DICKINSON et al., 1968b).

5. Es existieren verschiedene biologisch stabile Scrapie-Stämme, die im selben Maus-Genotyp unterschiedliche Inkubationszeiten hervorrufen (FRASER, 1979b).

2.4.3. Ausbreitung des Scrapie-Agens

Für die Ausbreitung des Scrapie-Agens kommen mehrere Wege in Frage:
1. neurotrop (ähnlich wie beim Herpes-Simplex-Virus)
2. Ausbreitung im ZNS über die Gliazellen
3. hämatogen

Die neurotrope Ausbreitung des Agens wurde u.a. von BUYUKMIHCI nach intrabulbärer Inokulation beschrieben (BUYUKMIHCI et al., 1983). Auch KIMBERLIN berichtet über Hinweise auf einen neuralen Aufstieg des Agens im Rückenmark (KIMBERLIN et al., 1982). Die von KIMBERLIN angegebene Geschwindigkeit des Agenstransportes liegt jedoch deutlich unter 1 mm/d, der bisher niedrigsten nachgewiesenen Geschwindigkeit des "slow axoplasmatic transport" (WEISS et al., 1948; DROZ et al., 1963; TAYLOR et al., 1965).

Diese Diskrepanz wirft die Frage auf, ob nicht eine Ausbreitung über die Gliazellen möglich wäre, eine Vermutung, die auch BUYUKMIHCI als Alternative zur neurotropen Verbreitung diskutiert (BUYUKMIHCI et al., 1983).

Gegen eine hämatogene Verteilung der Infektiosität sprach bisher die außerordentlich geringe Virämie in den Anfangsstadien der Erkrankung. Jedoch konnte DIRINGER in jüngster Zeit nachweisen, daß in Gehirnen gesunder Hamster, die eine intraperitoneale Injektion von 2 ml Blut eines Scrapie-infizierten Hamsters erhalten hatten, nach 5 - 10 Tagen Scrapie-Infektiosität festzustellen war (DIRINGER, 1984). Aufgrund dieses Experimentes von DIRINGER könnte eine hämatogene Komponente bei der Infektionsausbreitung im Organismus von Bedeutung sein.

Auch KIMBERLIN hat sich mit der Möglichkeit einer hämatogenen Ausbreitung beschäftigt, da er infolge eigener Untersuchungen feststellen konnte, daß sich das Agens bereits wenige Tage nach Infektion in den meisten Körpergeweben nachweisen läßt (KIMBERLIN et al., 1983).

3. Fragestellung

Histopathologische Untersuchungen des Gehirns Scrapie-infizierter Tiere haben bisher eine Vielzahl qualitativer Informationen über Zellveränderungen von Neuronen und Gliazellen erbracht (HADLOW, 1961; PATTISON et al., 1963; BECK et al., 1964; FIELD et al., 1964; PRUSINER et al., 1979).

Quantitative Studien, die den zeitlichen Verlauf der Erkrankung vor allem auch in frühen Stadien vor dem Auftreten erster klinischer Symptome berücksichtigen, fehlen bisher.

Da sowohl über den Infektionsweg als auch über das Vorhandensein einer möglichen Zielzelle ("target cell") im ZNS, die vom Erreger primär geschädigt wird, noch keine Klarheit herrscht, erscheint es sinnvoll, eine systematische quantitative Untersuchung durchzuführen, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung bis hin zum finalen Stadium Veränderungen von Zahl und Form der Gliazellen und Neuronen beschreibt.

Der Thalamus wurde als zu untersuchendes Gebiet deshalb gewählt, weil bei den erkrankten Tieren neben motorischen Ausfällen auch vegetative Störungen vorhanden sind, und dieses Kerngebiet in den Regelkreisen vegetativer und auch motorischer Steuerung eine wesentliche Bedeutung besitzt.

4. Material und Methoden

4.1. Durchführung der Tierversuche und Erstellung der histologischen Präparate

Der in unseren Versuchen verwendete Scrapie-Stamm 263 K wurde uns von Dr. R. H. KIMBERLIN, Institut for Research of Animal Diseases, Compton, Großbritannien, zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde 1961 von SHANDLER aus Schafen isoliert und in Compton an Hamster adaptiert. In Compton durchlief das Scrapie-Agens drei Hamsterpassagen, im Institut für Virologie des Bundesgesundheitsamtes Berlin (Prof. Dr. H. DIRINGER) erfolgten drei weitere Hamsterpassagen.

Den CLAC-Hamsterstamm, welcher durch das Medical Research Council Laboratory Animal Center entwickelt wurde, stellte uns freundlicherweise Herr Dr. R. FRIJS (Institut für Virologie der Universität Gießen) zur Verfügung.

Die Versuchstiere wurden in Makrolon-Käfigen - Typ II (Bayer AG, Leverkusen) in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22° C Raumtemperatur gehalten. Als Nahrung erhielten die Tiere Standardfutter Altromin 1314 und Wasser ad libitum.

Die Infektion der Tiere erfolgte durch eine intraperitoneale Gabe von 0,1 ml einer 1 : 100 verdünnten Lösung eines scrapiekranken Hamsterhirnes. Zur Zeit der Infektion waren die weiblichen Hamster 6 - 8 Wochen alt. Ebenfalls im Alter von 6 - 8 Wochen erhielten die Kontrolltiere eine intraperitoneale Injektion von 0,1 ml einer 1 : 100 verdünnten Lösung normalen Hamsterhomogenats.

Vom 61. Tag post infectionem ab wurden jeweils im Abstand von ca. fünf Tagen zwei Tiere durch Äthernarkose getötet, die Kontrolltiere am 150. Tag post injectionem. Die Hirne wurden durch eine Perfusionsfixation mit einer gepufferten 10 %igen Formalinlösung von der linken Herzkammer aus in situ fixiert. Vorher wurden die Gefäße mit einer Ringerlösung mit einem Liquemin^{R}-Zusatz durchgespült. Die Hirne wurden ausnahmslos 7 µm dick und in Serie geschnitten. Die zur Auswertung der Schnitte benutzte Färbung war eine Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

4.2. Histologische Kriterien

In Vorserien wurde versucht, Spezialfärbungen für Astrozyten oder Oligodendrozyten zu finden, die eine selektive quantitative Auswertung der entsprechenden Gliazellen ermöglichten:

1. Azanfärbung
2. Klüver-Barrera
3. Kernechtrubin
4. Goldsublimat nach Cajal
5. Brom-Formol-Silbermethode nach Cajal
6. Gliafaserfärbung nach Gallyas aufgrund der physikalischen Entwicklung
7. Silbercarbonatmethoden nach Rio Hortega
8. Chromhämatoxylin-Phloxin nach Gomori
9. Goldsublimat nach Cajal, modifiziert nach Fraser für eine Astrozytengliose
10. v. Gieson

Die obengenannten Spezialfärbungen haben ausnahmslos den Nachteil, daß ihre Vorschriften zu kompliziert sind und/oder ihre Reproduzierbarkeit im quantitativen Serienbereich nicht hinreichend gegeben ist.

Es wurde deshalb routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Eine vollständige Differenzierung der einzelnen Gliazelltypen ist mit dieser Methodik nicht möglich.

Quantitative Versuche über den zeitlichen und morphologischen Ablauf der Scrapie-Erkrankung sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Deshalb war die vordringliche Aufgabe die, zu erfahren, in welchem Gebiet des Hirns zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung die massivsten Veränderungen vor sich gehen. Wir haben daher zunächst die Zellen in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe A: Neurone / Nervenzellen
Die Nervenzellen haben ein deutliches Karyolemm, ein in der Regel helleres Karyoplasma mit einem oder mehreren Nucleoli. Das Chromatin ist gewöhnlich nicht homogen verteilt, sondern fadenförmig mit einzelnen punktförmigen Verdickungen. In der Regel sieht man auch Nissel-Schollen im perikaryalen Zytoplasma.

Gruppe B: Gliazellen
Gliazellen besitzen ein relativ dicht gelagertes Chromatin, welches über die gesamte Karyoplasmafläche gleichmäßig verteilt ist. Es wurden alle Gliazellen gezählt, d.h. Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen.

Gruppe 1: Gliazellen mit normalgeformtem Kern, d.h. nicht verändertem Karyolemm und deutlich strukturiertem Karyoplasma.

Gruppe 2: Gliazellen mit auffallender Hyper- oder Hypochromasie, verändertem Karyolemm, bzw. nicht mehr deutlich strukturiertem Karyoplasma. Die meisten der in dieser Gruppe vertretenen Zellen zeigen die charakteristischen Merkmale des Beginns bzw. Fortschreitens einer Pyknose.

Gruppe C: Zelltrümmer nach abgelaufener Karyorhexis

Da vereinzelte Autoren darauf hinwiesen, daß bei der Scrapie-Erkrankung amyloide Plaques nachweisbar seien (BRUCE et al., 1975; WISNIEWSKI et al., 1975; FRASER, 1979; BRUCE et al., 1981), wurde zunächst einmal serienmäßig nach besonderen Faseranhäufungen mit Hilfe der v. Gieson-Färbung, Azanfärbung und der Klüver-Barrera-Färbung gesucht. Des weiteren wurden Spezialfärbungen für amyloide Plaques, u.a. Kongorot, angewandt. Im Gegensatz zu den obengenannten Autoren konnten jedoch bei unseren Untersuchungen keine massenhaften oder punktförmigen Ansammlungen von Fasern festgestellt werden, insbesondere konnten keine amyloiden Plaques gefunden werden.

4.3. Auswertung der Fotografien

Von dem zu untersuchenden Hirnareal wurden mikrofotografische Schwarz-Weiß-Positive in der Größe DIN A 4 hergestellt. Die Gesamtvergrößerung von 1027,2 linear setzt sich aus folgenden drei Faktoren zusammen:

1. Die Vergrößerung des Objketivs = 40
2. Der Vergrößerungsfaktor Kamera / Objektiv = 3,21
3. Der Vergrößerungsfaktor bei der Positivherstellung = 8 linear.

4.3.1. Das Auswertesystem

Die Auswertungen und statistischen Analysen wurden mit dem interaktiven Bildauswertesystem IBAS I der Firma KONTRON BILDANALYSE (Eching 6, München) vorgenommen.

Das System ist ausgelegt für Aufnahme und Verarbeitung von Daten geometrischer Strukturen und besteht aus einem Auswertetablett ("digitizer"), einem Schwarz-Weiß-Monitor, einem Zentralrechner und zwei "Floppy Disc Laufwerken" (8 inch). Die Disketten dienen als Programm- oder als Datenspeicher.

Das Auswertetablett besitzt ein Meßfeld von 28 x 26 cm. Es arbeitet nach dem sog. magnetostriktiven Prinzip. Ferromagnetische Drähte sind regelmäßig in engem Abstand in X-und Y-Richtung angeordnet und erzeugen ein permanentes Magnetfeld. Zusätzlich leiten sie elektronisch erzeugte Pulse, die in beiden Richtungen laufen. Ein elektronischer Meßgriffel, mit dem die auszuwertenden Strukturen auf dem Tablett umfahren bzw. angetippt werden, unterbricht die magnetischen Impulse, und der Rechner errechnet aus dem entstehenden Pulsmuster die gewünschten geometrischen Daten der untersuchten Struktur.

4.3.2. Zellzählung

Das zur Zellzählung benötigte Programm ist auf einer Programmdiskette (8 inch Floppy Discs, double sided, double density, Speicherkapazität 1 Mbyte) der Firma BASF (Ludwigshafen) gespeichert. Eine zweite Diskette, die als Datendiskette dient, nimmt die ermittelten Wer-

te auf. Gezählt werden drei Zelltypen: Gliazellen der Gruppe 1, Gliazellen der Gruppe 2 und Neurone. Für jeden dieser Zelltypen ist im Rechner ein sog. "Channel" eingerichtet. So beinhaltet Channel 1 die Glia der Gruppe 1, Channel 2 die Glia der Gruppe 2, Channel 3 die Neurone.

Ermittelt werden soll die Anzahl dieser Zellen bezüglich einer definierten Fläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung. Die Fläche ergibt sich aus der Größe des Schwarz-Weiß-Positives, die 21 x 29,7 cm beträgt. Da aus Gründen der Vergrößerungstechnik nicht die gesamte Bildfläche auswertbar ist, wurde ein Areal von 18 x 28 cm = 504 cm² festgelegt. Aufgrund des Vergrößerungsfaktors von 1027,2 linear entspricht somit 1 cm Fotofläche 9,7352 µm real. Das Gesamtareal beträgt demnach 0,0478 mm² real.

Bei Einstellung des Rechners auf einen Vergrößerungsfaktor von 1027,2 ergibt sich folgende Anzeige für den Flächenwert:

$4{,}78 \times 10^{4}$ µm² = $4{,}78 \times 10^{-2}$ mm² = 0,0478 mm².

Da dieser Wert vom Rechner auf 0,05 gerundet wird und zwar für alle Werte zwischen 0,0450 - 0,0549, ist diese Einstellung nicht sinnvoll, weil keine Kontrolle über die Genauigkeit der vermessenen Fläche möglich ist. Daher wurde die Einstellung des Vergrößerungsfaktors im Rechner um eine Zehnerpotenz, d.h. auf 102,72 linear, verändert. Damit ergibt sich folgende Anzeige:

$$4{,}78 \times 10^{6} \text{ µm}^2 = 4{,}78 \text{ mm}^2$$

Aufgrund dieses auf dem Monitor angezeigten Wertes ist eine ausreichende Kontrolle über den Meßfehler bei der Flächenmessung möglich.

Die Zellzählung wird wie folgt durchgeführt: ein Foto eines 36 Bilder umfassenden Filmes wird auf das Auswertetablett gelegt. Man beginnt mit Channel 1, also Gliazellkerne der Gruppe 1 und tippt mit dem elektronischen Meßgriffel die entsprechenden Zellen auf dem Foto an. Diese werden beim Antippen gleichzeitig markiert, um ein mehrfaches Zählen auszuschließen. Danach wird das definierte Areal von 18 x 20 cm mit dem Meßgriffel umfahren, und der Rechner ermittelt sofort die Anzahl der gemessenen Punkte/Areal. Auf dem Schwarz-Weiß-Monitor erscheint die Summe der angetippten Punkte (Pt), die gemessene Fläche (Ar) und das Verhältnis Punkte zu Fläche (Pt/Ar).

Für die Messungen wurden Flächenwerte zwischen 4,69 und 4,91 akzeptiert. Bei Werten darüber oder darunter wurde die Messung wiederholt.

Die auf dem IBAS I-Monitor dargestellten Werte beziehen sich grundsätzlich auf mm bzw. mm². Da der Vergrößerungsfaktor um einen Faktor 10 linear kleiner als real eingegeben wurde, sind die gemessenen Zelldichten auf eine Fläche von 1/100 mm² bezogen, entsprechend einer Fläche von 100 x 100 µm bzw. 10000 µm². Beispiel: 15 Pt auf 4,8 Ar = 3,125 Pt/Ar. Dies bedeutet, daß 15 Zellkerne auf einer realen Fläche von 0,048 mm² bzw. 3,125 Zellkerne auf 0,01 mm² gezählt wurden. Das entspricht 312,5 Zellkernen auf 1 mm².

Die Zählungen in Channel 2 und Channel 3 werden ebenso durchgeführt. Nachdem alle 36 Bilder nach diesem Verfahren ausgewertet worden sind, werden die gewonnenen Meßergebnisse in einen sog. "File" eingespeichert, der jederzeit abrufbereit ist.

4.3.3. Messung der Zellkerngröße und der Flächen-Formfaktoren

Bei der Bestimmung der Zellkerngröße und der Flächen-Formfaktoren ist das methodische Vorgehen ähnlich der Zellzählung. Bei einem Vergrößerungsfaktor von 1027,2 linear entsprechen 10 mm Fotofläche 9,7352 µm real. Da sich die auf dem IBAS I-Monitor dargestellten Werte grundsätzlich auf mm beziehen, müßten hierbei 0,0097352 mm angezeigt werden. Jedoch wird dieser Wert vom Rechner auf 0,01 mm gerundet. Um aber genauere Ergebnisse zu erzielen, stellt man den Vergrößerungsfaktor um drei Zehnerpotenzen kleiner, d.h. auf 1,0272, ein. Daraus ergibt sich bei einem Meßwert von z.B. 15,25 folgende Anzeige:

15,25 mm bei einem Vergrößerungsfaktor von 1,0272.

Dies entspricht bei einem Vergrößerungsfaktor von 1027,2

= 0,01525 mm real = 15,25 µm real.

Ein Schwarz-Weiß-Positiv wird auf das Auswertetablett gelegt. Man beginnt mit den Gliazellen der Gruppe 1, für die im Rechner wieder Channel 1 vorgesehen ist. Mit dem Meßgriffel werden nun die Zellkerne eindeutig zu identifizierender Gliazellen der Gruppe 1 von einem beliebigen Punkt aus umfahren. Ist der Ausgangspunkt wieder erreicht, erscheint auf dem Monitor die vom Rechner ermittelte Fläche (Area) sowie der Umfang (Perimeter) des Zellkerns. Wird z.B. ein Umfang von 18,12 gemessen, bedeutet dies, daß der Zellkern einen realen Umfang von 18,12 µm aufweist. Wird dieser Wert durch π geteilt, erhält man den Durchmesser des Zellkerns, hier 5,77 µm.

Neben Fläche und Umfang gibt der Rechner auch noch den sog. Flächen-Formfaktor an. Beträgt nach Umfahren eines Zellkerns dieser Formfaktor 1, bedeutet dies, daß der Kern eine kreisrunde Form besitzt. Je mehr der Wert kleiner 1 wird, desto unregelmäßiger ist die äußere Form des Zellkerns. Die für die Ermittlung der Flächen-Formfaktoren in den Rechner eingegebene Formel, die sich auf ellipsoide Formen bezieht, lautet:

$$\frac{F}{A \cdot B \cdot \frac{\pi}{4}}$$

F = Fläche des Zellkerns
A = großer Durchmesser (der Ellipse)
B = kleiner Durchmesser (der Ellipse)

Nach diesem beschriebenen Schema wird auch bei der Glia der Gruppe 2 und den Neuronen verfahren, wobei ausnahmslos eindeutig zu identifizierende Zellkerne Berücksichtigung finden. Nachdem für jeden Channel etwa 150 Zellkerne ausgemessen worden sind, werden auch hier wieder die ermittelten Meßergebnisse in einem File gespeichert.

4.3.4. Korrekturverfahren

Die beschriebenen Methoden und die daraus resultierenden Meßergebnisse basieren auf der Grundlage einer Flächenauswertung. Dabei fand die Schnittdicke des Präparates keine Berücksichtigung. Um aber die tatsächliche Kerndichte des zu untersuchenden Gebietes zu ermitteln, muß die Schnittdicke in die Berechnungen mitaufgenommen

werden. Dies geschieht durch Anwendung der Korrekturformel nach ABERCROMBIE (aus dem Jahre 1946), die sich wie folgt zusammensetzt:

$$P = A \cdot \frac{M}{d + M}$$

P = tatsächliche Anzahl der Kerne/mm²
A = Anzahl der auf dem Schnitt sichtbaren Kerne
M = Schnittdicke
d = Kerndurchmesser

Beispiel: A = 265 / mm²
M = 7 µm
d = 5,77 µm

$$p = 265 \cdot \frac{7}{7 + 5,77}$$

Somit ergibt sich nach dieser Korrekturformel eine tatsächliche Kernanzahl von 145 auf 1 mm².

5. Ergebnisse

5.1. Zellzählung

Zur Darstellung der Meßergebnisse wurde ein Koordinatensystem gewählt, in dem auf der Abszisse die gezählten Zellkerne/ Fläche (PT/AREA) aufgetragen sind. Die Skala umfaßt den Gesamtbereich der vorkommenden Zelldichten, der in 20 Untereinheiten (Klassen) aufgeteilt wurde. Der Rechner ordnet die Summe der gemessenen Werte in diese 20 verschiedenen Klassen ein. Dabei zeigt die Ordinate die Häufigkeit der Belegung der einzelnen Klassen an.

Bei der Glia der Gruppe 1 (Channelgroup 1) besitzt jede Klasse 0,4 Einheiten, bei der Glia der Gruppe 2 (Channelgroup 2) 0,8 Einheiten und bei den Neuronen (Channelgroup 3) beinhaltet jede Klasse 0,7 Einheiten.

Für die Kontrollen wurden drei verschiedene Tiere ausgewählt, die als H KONA, H KONB und H KONC bezeichnet werden.

Bei der Ermittlung Pt/Area ergibt sich nach 708 Messungen ein Mittelwert von 4,83 bei einer Standardabweichung von 0,04.

5.1.1. Gliazellkerne der Gruppe 1

Abb. 1 zeigt die Zelldichte beim Kontrolltier H KONA, die auf der Auswertung von 349 Schwarz-Weiß-Positiven basiert.

Die größte Kerndichte mit 273 von 349 findet in den Klassen 5 - 9 statt. 28 Pt/Area wurden in den Klassen 3 und 4, und 33 Pt/Area in den Klassen 10 und 11 gezählt. Somit ergibt sich ein prozentualer Anteil von 8,02 % in den Bereichen 0,8 -1,6, 78,22 % in den Bereichen 1,6 - 3,6 und 9,46 % in den Bereichen 3,6 - 4,4. Der Mittelwert liegt bei 2,65, die Standardabweichung beträgt 0,93. Demnach kommen auf 1 mm² im Mittel 265 Zellkerne von Gliazellen der Gruppe 1.

Abb. 2 stellt die Zelldichte beim Kontrolltier H KONB dar, wobei 179 Bilder ausgewertet wurden. Die Kerndichte ist hier in der Klasse 8 am größten. Aber auch die Klassen 6 und 7, sowie 9 und 10 weisen einen gleichmäßig hohen Anteil auf. Somit entfallen auf die Klassen 6 - 10 137 von 179, auf die Klassen 4 und 5 14, sowie auf die Klassen 11 - 14 28 Pt/Area. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von 76,54 % für die Bereiche 2,0 - 4,0, 7,82 % für die Bereiche 1,2 - 2,0 und 15,64 % für die Bereiche 4,0 - 5,6. Der Mittelwert liegt bei 3,13 (=313 Zellkerne/mm²) bei einer Standardabweichung von 0,87.

In Abb. 3 ist die Zellkerndichte beim Kontrolltier H KONC aufgetragen, die das Ergebnis von 180 Auswertungen darstellt. Die höchste Kerndichte ist mit 144 von 180 in den Klassen 5 -8 zu finden. Die Klassen 9 und 10 weisen mit 27 Pt/Area einen wesentlich geringeren Anteil auf, während die Klassen 4 und 11 mit 5 bzw. 4

Pt/Area keine Bedeutung haben. In den Bereichen 1,6 - 3,2 resultiert demnach ein Anteil von 80,0 %, in den Bereichen 3,2 - 4,0 von 15,0 %. Bei einem Mittelwert von 2,75 und einer Standardabweichung von 0,88 liegt die reale Anzahl mit 275 Zellkernen auf 1 mm² im Bereich von H KONA. In Abb. 4 sind alle drei Kontrolltiergruppen zusammengefaßt worden. Deutlich ist dabei zu sehen, daß die größte Zellkerndichte mit 397 von 708 in den Klassen 6 -8 zu finden ist. Das entspricht 56,07 % in den Bereichen 2,0 - 3,2. Somit ergibt sich ein Mittelwert von 2,75 (= 275 Zellkerne/mm²) bei einer Standardabweichung von 0,88.

Abb. 5 zeigt die Zelldichte eines 16 Wochen alten Versuchstieres am 61. Tag p.i. (H 14/2). Ausgewertet wurden 141 Schwarz-Weiß-Positive.

Die größte Dichte mit 88 von 141 findet in den Klassen 8 - 11 statt. In den Klassen 6 und 7 wurden 15, in den Klassen 12 und 13 23 Pt/Area gezählt. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von 10,64 % in den Bereichen 2,0 - 2,8, 62,41 % in den Bereichen 2,8 - 4,4 und 16,31 % in den Bereichen 4,4 - 5,2. Der Mittelwert liegt bei 3,91, die Standardabweichung beträgt 1,08. Somit verteilen sich auf 1 mm² 391 Zellkerne.

Abb. 6 gibt die Dichte der Zellkerne bei einem 16 1/2 Wochen alten Versuchstier am 64. Tag p.i. (H14/4) wieder, wobei die Auswertung 166 Bilder umfaßt. Die Zelldichte ist in den Klassen 6 - 10 mit 131 von 166, was 78,92 % in den Bereichen 2,0 - 4,0 entspricht, am höchsten. Der Mittelwert beträgt 3,23 (= 323 Zellkerne/mm²), die Standardabweichung 0,95.

Abb. 7 gibt einen zusammenfassenden Überblick der Meßergebnisse beider Versuchstiere wieder. Dabei liegt die größte Zellkerndichte in den Klassen 6 - 13 mit einer eindeutigen Spitze in Klasse 8. Die meisten Pt/Area wurden in den Klassen 7 - 10 gemessen (= 60,26 % in den Bereichen 2,4 - 4,0). Bei einer Standardabweichung von 1,06 liegt die mittlere Kerndichte bei 354/mm² und ist somit im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant höher.

In Abb. 8 ist die Zellkerndichte eines 17 - 18 Wochen alten Versuchstieres am 70. Tag p.i. (H 14/6) aufgetragen, wobei 288 Schwarz-Weiß-Positive ausgewertet wurden. Eindeutig am höchsten ist die Kerndichte mit 165 von 288 in den Klassen 6 - 8. In den Klassen 9 und 10 finden sich 53 Pt/Area, in den Klassen 11 und 12 27 Pt/Area und in der Klasse 5 noch 22 Pt/Area. Dies ergibt bei einer Standardabweichung von 0,92 einen prozentualen Anteil von 57,29 % für die Bereiche 2,0 -3,2, woraus der Mittelwert von 2,93 (= 293 Zellkerne/mm²) resultiert.

Abb. 9 zeigt die Zelldichte bei einem 18 - 19 Wochen alten Versuchstier am 77. Tag p.i. (H 14/8). Ausgewertet wurden 142 Fotografien.

Mit 111 von 142 ist die Kerndichte in den Klassen 6 - 9 am höchsten, was 78,17 % in den Bereichen 2,0 - 3,6 entspricht. Dabei nimmt der Bereich von 2,4 - 2,8 (Klasse 7) eine Spitzenstellung ein. Im Mittel kommen auf 1 mm² 296 Zellkerne, die Standardabweichung beträgt 0,78.

Abb. 10 faßt die Meßergebnisse der beiden Versuchstiere H 14/6 und H 14/8 zusammen. Mit 341 von 430 ist die Verteilung in den Klassen 6 - 10 am größten, die höch-

ste Dichte ist jedoch in Klasse 7 festzustellen. Der prozentuale Anteil in den Bereichen von 2,0 - 4,0 beträgt 79,30 %, woraus sich bei einer Standardabweichung von 0,88 ein Mittelwert von 2,94 (= 294 Kerne/mm²) ergibt. Dieser Wert liegt zwar signifikant unter dem der Versuchstiere H 14/2 und H 14/4, jedoch ist er immer noch etwas höher als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,1$).

Die Zellkerndichte eines 22 Wochen alten Versuchstieres am 106. Tag p.i. (H 14/20) zeigt Abb. 11. Von insgesamt 172 Auswertungen entfallen 81 auf die Klassen 7 und 8, 50 auf die Klassen 5 und 6,sowie 33 auf die Klassen 9 und 10. Auf die Bereiche von 2,4 - 3,2 entfallen somit 47,09 %, von 1,6 - 2,4 29,07 % und von 3,2 - 4,0 19,19 %. Bei einer Standardabweichung von 0,63 liegt der Mittelwert bei 270 Zellkernen/mm², was dem Wert der Kontrolltiere entspricht ($p < 0,01$).

In Abb. 12 ist die Zelldichte eines 24 - 25 Wochen alten Versuchstieres am 124. Tag p.i. (H 14/28) nach Auswertung von 175 Schwarz-Weiß-Positiven zu sehen.

Auffallend ist, daß die Klassen 5 - 8 fast identische Werte aufweisen und mit 63,43 % in den Bereichen 1,6 - 3,2 auch den größten Anteil besitzen. In den Bereichen 3,2 - 4,4 (Klasse 9 - 11) beträgt der prozentuale Anteil noch 28,0 %. Daraus ergibt sich eine mittlere Zelldichte von 288/mm² bei einer Standardabweichung von 0,98. Damit liegt die mittlere Kerndichte höher als bei dem H 14/20-Versuchstier ($p < 0,1$).

Abb. 13 zeigt die Zellkerndichte bei einem 25 - 26 Wochen alten Versuchstier am 127. Tag p.i. (H14/30) nach Auswertung von 215 Fotografien.

Dabei hat die Klasse 6 und 7 mit 88 von 215 den höchsten Anteil an Zellkernen. Die Klassen 4 und 5 mit 60 sowie die Klassen 8 und 9 mit 25 weisen auch noch eine erhöhte Kerndichte auf. Somit liegt der prozentuale Anteil in den Bereichen 1,2 - 2,0 bei 27,91 %, in den Bereichen 2,0 - 2,8 bei 40,93 % und in den Bereichen 2,8 - 3,6 bei 11,63 %. Daraus folgt bei einer Standardabweichung von 0,78 ein Mittelwert von 224 Zellkernen/mm².

Somit ergibt sich bei der Zusammenfassung der Meßergebnisse der Versuchstiere H 14/28 und H 14/30, die in Abb. 14 aufgetragen ist, ein deutliches Übergewicht in den Klassen 5 - 8. Bei einem prozentualen Anteil von 66,92 % in den Bereichen 1,6 - 3,2 und einer Standardabweichung von 0,93 beträgt die Zellkerndichte im Mittel 253/mm². Dieser Wert liegt unter dem vom Versuchstier H 14/20 ($p < 0,1$).

In Abb. 15 ist die Kerndichte eines 27 Wochen alten Versuchstieres am 137. Tag p.i. (H 14/37) aufgetragen, wobei 141 Bilder ausgewertet wurden.

Hier liegt die größte Zelldichte mit 80,85 % in den Bereichen 1,2 - 2,4 (Klasse 4 - 6). Der daraus resultierende Mittelwert von 1,66 (= 166 Zellkerne/mm²) liegt bei einer Standardabweichung von 0,47 nicht signifikant unter dem des etwa 10 Tage jüngeren Versuchstieres H 14/30.

Noch deutlicher ist das Absinken der Zellkerndichte der Gruppe 1-Glia in Abb. 16 zu erkennen. Nach Auswertung von 200 Schwarz-Weiß-Positiven ist am 145. Tag p.i. (H 14/43) eines 28 Wochen alten Versuchstieres die Kerndichte mit 170 von 200 in den Klassen 2 - 4 am größten, was 85,0 % in den Bereichen 0,4 - 1,6 entspricht. Dar-

aus ergibt sich bei einer Standardabweichung von 0,49 ein Mittelwert von 105 Zellkernen auf 1 mm².

Am deutlichsten ist die sinkende Zahl Gliazellkerne der Gruppe 1 in Abb. 17 zu sehen. Das Versuchstier H 14/45 ist am 148. Tag p.i. nur drei Tage älter als das Tier H 14/43 und weist die größte Kerndichte mit 280 von 317 in der Klasse 1 und 2 auf, was 88,33 % in den Bereichen 0,0 - 0,8 entspricht. Daraus resultiert bei einer Standardabweichung von 0,29 eine mittlere Zellkerndichte von nur 40/mm²

Tab. 4 und Abb. 18 geben einen zusammenfassenden Überblick über die Kerndichte von Gliazellen der Gruppe 1 zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten.

Versuchstier	Alter in Wochen	Tag p.i.	mittlere Zellkerndichte/mm²
H KON A,B,C	29		275
H 14/2,4	16-17	61,64	354
H 14/6,8	17-19	70,77	294
H 14/20	22	106	270
H 14/28,30	24-26	124,127	253
H 14/37	27	137	166
H 14/43	28	145	105
H 14/45	28 1/2	148	40

Tab. 4

5.1.2. Gliazellkerne der Gruppe 2

Abb. 19 zeigt die Zelldichte beim Kontrolltier H KONA, die auf der Auswertung von 349 Schwarz-Weiß-Positiven basiert. Die größte Kerndichte mit 250 von 349 findet in der Klasse 2 statt. 80 Pt/Area wurden in der Klasse 3, 35 Pt/Area in der Klasse 1 gezählt. Somit ergibt sich ein prozentualer Anteil von 10,03 % in den Bereichen 0,0 - 0,8, 61,61 % in den Bereichen 0,8 - 1,6 und 22,92 % in den Bereichen 1,6 - 2,4. Der Mittelwert liegt bei 1,38, die Standardabweichung beträgt 0,60. Demnach kommen auf 1 mm² im Mittel 138 Gliazellkerne der Gruppe 2.

Abb. 20 stellt die Zelldichte beim Kontrolltier H KONB dar, wobei 179 Bilder ausgewertet wurden. Die Kerndichte ist hier in der Klasse 2 mit 95 Pt/Area am größten, aber auch die Klasse 3 mit 80 Pt/Area weist einen hohen Anteil auf. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von 53,07 % für die Bereiche 0,8 -1,6 und 44,69 % für die Bereiche von 1,6 - 2,4. Der Mittelwert beträgt 1,56 (= 156 Zellkerne/mm²) bei einer Standardabweichung von 0,38.

In Abb. 21 ist die Zellkerndichte beim Kontrolltier H KONC aufgetragen, die das Ergebnis von 180 Auswertungen darstellt. Die höchste Kerndichte ist mit 78 bzw. 90 Pt/Area in den Klassen 2 bzw. 3 zu finden. In den Bereichen 0,8 - 1,6 resultiert demnach ein Anteil von 43,33 %, in den Bereichen 1,6 - 2,4 von 50 %. Der Mittelwert beträgt 1,66 bei einer Standardabweichung von 0,42. In Abb. 22 sind die drei Kontrolltiergruppen zusammengefaßt worden. Dabei ist deutlich zu erkennen, daß die größte Kerndichte in den Klassen 2 (388 von 708) und 3 (250 von 708) zu finden ist. Dies entspricht

54,80 % in den Bereichen 0,8 - 1,6 und 35,31 % in den Bereichen 1,6 - 2,4. Somit ergibt sich ein Mittelwert von 149 Zellkernen/mm² bei einer Standardabweichung von 0,52.

Abb. 23 zeigt die Zelldichte eines 16 Wochen alten Versuchstieres am 61. Tag p.i. (H 14/2). Ausgewertet wurden 141 Schwarz-Weiß-Positive.

Die größte Dichte befindet sich mit 55 Pt/Area in der Klasse 3 und mit 58 Pt/Area in der Klasse 4. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von 39,0 % für die Bereiche 1,6 - 2,4 und 41,14 % für die Bereiche 2,4 - 3,2. Der Mittelwert liegt bei 254 Kernen/mm², die Standardabweichung beträgt 0,69.

Abb. 24 gibt die Dichte der Zellkerne bei einem 16 1/2 Wochen alten Versuchstier am 64. Tag. p.i. (H 14/4) wieder, wobei die Auswertung 166 Bilder umfaßt. Die Zelldichte ist in der Klasse 3 und 4 mit 131 von 166, was 78,92 % in den Bereichen 1,6 -3,2 entspricht, am höchsten. Der Mittelwert beträgt 2,33 (= 233 Kerne/mm²), die Standardabweichung 0,64.

Abb. 25 gibt einen zusammenfassenden Überblick der Meßergebnisse beider Versuchstiere wieder. Dabei liegt die größte Kerndichte mit fast identischen Werten von 123 bzw. 121 Pt/Area in den Klassen 3 und 4. Zusammengenommen ergibt sich ein Anteil von 79,48 % für die Bereiche 1,6 - 3,2. Bei einer Standardabweichung von 0,67 liegt die mittlere Kerndichte demnach bei 242/mm², somit nicht signifikant höher als bei den Kontrolltieren.

In Abb. 26 ist die Zellkerndichte eines 17 - 18 Wochen alten Versuchstieres am 70. Tag p.i. (H 14/6) aufgetragen, wobei 288 Schwarz-Weiß-Positive ausgewertet wur-

den. Auch hier ist die höchste Dichte in der Klasse 3 mit 125 und 4 mit 120 Pt/Area zu finden. Insgesamt entfallen auf die Bereiche 1,6 - 3,2 somit 85,07 %, was bei einer Standardabweichung von 0,65 eine Kerndichte von 244/mm² im Mittel bedeutet.

Abb. 27 zeigt die Zelldichte bei einem 18 - 19 Wochen alten Versuchstier am 77. Tag p.i. (H 14/8). Ausgewertet wurden 142 Fotografien. Die Spitzenstellung nimmt eindeutig mit 90 Pt/Area die Klasse 3 ein. Dies bedeutet 63,38 % in den Bereichen 1,6 - 2,4. Daraus resultiert bei einer Standardabweichung von 0,50 ein Mittelwert von 2,03 (= 203 Zellkerne/mm²).

Abb. 28 faßt die Meßergebnisse der beiden Versuchstiere H 14/6 und H 14/8 zusammen. Folglich ist der größte Anteil von Zellkernen in den Klassen 3 und 4 mit 215 bzw. 150 von 430 zu verzeichnen. Dies entspricht mit 84,88 % in den Bereichen 1,6 - 3,2 bei einer Standardabweichung von 0,63 einem Mittel von 230 Zellkernen auf 1 mm². Dieser Wert liegt zwar unter dem der Versuchstiere H 14/2 und H 14/4 ($p < 0,05$), ist aber nicht signifikant höher als der Mittelwert der Kontrollgruppe.

Die Zellkerndichte eines 22 Wochen alten Versuchstieres am 106. Tag p.i. (H 14/20) zeigt Abb. 29. Von insgesamt 172 Auswertungen entfallen 108 auf die Klasse 3 und 50 auf die Klasse 4. Somit liegt der prozentuale Anteil im Bereich von 1,6 - 2,4 bei 62,79 %, im Bereich von 2,4 - 3,2 bei 29,07 %. Damit ist die mittlere Kerndichte, die bei einer Standardabweichung von 0,47 224/mm² beträgt, nicht signifikant höher als bei den Kontrolltieren. In diesem Erkrankungsstadium konnten bei der Untersuchung der Kerndichte der Gruppe 1-Glia Werte festgestellt werden, die denen der Kontrollgruppe entsprachen. Da die erwartete Angleichung bei den Gruppe 2-Gliazellker-

nen nicht stattfindet, kann angenommen werden, daß zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung schon ein Anstieg von Gliazellen der Gruppe 2 zu verzeichnen ist.

In Abb. 30 ist die Zelldichte eines 24 - 25 Wochen alten Versuchstieres am 124. Tag p.i. (H 14/28) nach Auswertung von 175 Schwarz-Weiß-Positiven zu sehen.

Die höchste Kerndichte mit 24,57 % weisen die Bereiche 1,6 - 2,4 (Klasse 3), mit 50,29 % die Bereiche 2,4 - 3,2 (Klasse 4), sowie mit 16,0 % die Bereiche 3,2 - 4,0 (Klasse 5) auf. Daraus ergibt sich eine mittlere Zelldichte von 279/mm² bei einer Standardabweichung von 0,69. Damit setzt sich der Anstieg von Gliazellkernen der Gruppe 2 fort und bestätigt die Annahme, daß dieses Ansteigen schon beim Versuchstier H 14/20, d.h. vom 106. Tag p.i. an, eingesetzt hat. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß in diesem Stadium auch die Dichte der Gruppe 1-Gliazellen erhöht war.

Abb. 31 zeigt die Zellkerndichte bei einem 25 - 26 Wochen alten Versuchstier am 127. Tag p.i. (H 14/30) nach Auswertung von 215 Fotografien. Dabei hat die Klasse 3 mit 85 und die Klasse 4 mit 98 von 215 den höchsten Anteil an Zellkernen. Somit liegt der prozentuale Anteil in den Bereichen 1,6 - 2,4 bei 39,54 %, in den Bereichen 2,4 - 3,2 bei 45,58 %. Daraus folgt bei einer Standardabweichung von 0,61 ein Mittelwert von 253 Zellkernen/mm². Dieser Wert liegt zwar niedriger als der von H 14/28 ($p < 0,1$), jedoch signifikant über dem des Versuchstieres H 14/20.

Damit ergibt sich bei der Zusammenfassung der Meßergebnisse der Versuchstiere H 14/28 und H 14/30, die in Abb. 32 aufgetragen ist, ein deutliches Übergewicht in

den Klassen 3 und 4. Bei einem prozentualen Anteil von 32,82 % in den Bereichen 1,6 - 2,4 und 47,69 % in den Bereichen 2,4 - 3,2 und einer Standardabweichung von 0,66 beträgt die Zellkerndichte im Mittel 264/mm².

In Abb. 33 ist die Kerndichte eines 27 Wochen alten Versuchstieres am 137. Tag p.i. (H 14/37) aufgetragen, wobei 141 Bilder ausgewertet wurden.

Hier liegt die größte Zelldichte mit 46,10 % in den Bereichen 2,4 - 3,2 (Klasse 4) und mit 29,79 % in den Bereichen 3,2 -4,0 (Klasse 5). Der daraus resultierende Mittelwert von 3,17 (= 317 Zellkerne/mm²) liegt bei einer Standardabweichung von 0,74 signifikant über dem des etwa zehn Tage jüngeren Versuchstieres H 14/30.

Noch deutlicher ist der Anstieg der Kerndichte von Gruppe 2-Gliazellen in Abb. 34 zu erkennen. Nach Auswertung von 200 Schwarz-Weiß-Positiven ist am 145. Tag p.i. (H 14/43) eines 28 Wochen alten Versuchstieres die Kerndichte mit 157 von 200 in den Klassen 7 - 10 am größten, was 78,5% in den Bereichen 4,8 - 8,0 entspricht. Daraus ergibt sich bei einer Standardabweichung von 1,27 ein Mittelwert von 627 Gliazellkernen der Gruppe 2/mm².

Am deutlichsten ist die steigende Zahl von Gruppe 2-Gliazellkernen in Abb. 35 zu sehen. Das Versuchstier H 14/45 ist am 148. Tag p.i. nur drei Tage älter als das Tier H 14/43 und weist die höchste Kerndichte mit 271 von 317 in den Klassen 7 - 12 auf. Dabei nimmt die Klasse 9 mit 68 eine Spitzenstellung ein. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von 85,49 % in den Bereichen 4,8 - 9,6 und ein Mittelwert von 708 Zellkernen/mm². Die Standardabweichung ist wie schon beim Versuchstier H 14/43 mit 1,71 auffallend hoch. Die Ursache

liegt in der schwierigen Differenzierung zwischen klar erkennbaren Gliazellkernen der Gruppe 2 und in diesem Erkrankungsstadium massenweise auftretenden Zelltrümmern.

Tab. 5 und Abb. 36 geben einen zusammenfassenden Überblick über die Kerndichte der Gruppe 2-Gliazellen zu verschiedenen Erkrankungszeiten.

Versuchstier	Alter in Wochen	Tag p.i.	mittlere Zellkerndichte/mm²
H KONA,B,C	29		149
H 14/2,4	16-17	61,64	242
H 14/6,8	17-19	70,77	230
H 14/20	22	106	224
H 14/28,30	24-26	124,127	264
H 14/37	27	137	317
H 14/43	28	145	627
H 14/45	28 1/2	148	708

Tab. 5

5.1.3. Neurone

Abb. 37 zeigt die Zelldichte beim Kontrolltier H KONA, die auf der Auswertung von 349 Schwarz-Weiß-Positiven basiert. Die größte Kerndichte mit 213 von 349 ist in den Klassen 4 - 6 zu verzeichnen. Somit ergibt sich für die Bereiche von 2,1 - 4,2 ein prozentualer Anteil von 61,03 %. Der Mittelwert liegt bei 3,58, die Standardabweichung beträgt 1,54. Demnach kommen auf 1 mm² im Mittel 358 Neurone.

Abb. 38 stellt die Zellkerndichte beim Kontrolltier H KONB dar, wobei 179 Bilder ausgewertet wurden. Die Neuronendichte ist hier in den Klassen 3 - 6 mit 153 Pt/Area am höchsten, was 85,47 % in den Bereichen 1,4 -4,2 entspricht. Der Mittelwert beträgt 3,15 (= 315 Zellkerne/mm²) bei einer Standardabweichung von 1,22.

In Abb. 39 ist die Kerndichte beim Kontrolltier H KONC aufgetragen, die das Ergebnis von 180 Auswertungen darstellt. Die größte Kerndichte ist mit 119 Pt/Area in den Klassen 4 - 6 zu finden. In den Bereichen 2,1 - 4,2 resultiert demnach ein Anteil von 66,11 %. Bei einem Mittelwert von 3,62 und einer Standardabweichung von 1,26 beträgt die reale Anzahl 362 Zellkerne/mm².

In Abb. 40 sind die drei Kontrollgruppen zusammengefaßt worden. Dabei ist deutlich zu erkennen, daß die größte Kerndichte in den Klassen 4 - 6 (455 von 708) zu finden ist. Dies entspricht 64,27 % in den Bereichen 2,1 - 4,2. Somit ergibt sich ein Mittelwert von 348 Zellkernen/mm² bei einer Standardabweichung von 1,41.

Abb. 41 zeigt die Zelldichte eines 16 Wochen alten Versuchstieres am 61. Tag p.i. (H 14/2). Ausgewertet wur-

den 141 Schwarz-Weiß-Positive. Die größte Dichte befindet sich mit 103 von 141 in den Klassen 6 - 9. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von 73,05 % für die Bereiche 3,5 - 6,3. Der Mittelwert liegt bei 559 Kernen/mm², die Standardabweichung beträgt 1,69.

Abb. 42 gibt die Dichte der Neuronenkerne bei einem 16 1/2 Wochen alten Versuchstier am 64. Tag p.i. (H 14/4) wieder, wobei die Auswertung 166 Bilder umfaßt. Die Zelldichte ist in den Klassen 5 - 8 mit 117 von 166, was 70,48 % in den Bereichen 2,8 - 5,6 entspricht, am höchsten. Der Mittelwert beträgt 4,44 (= 444 Kerne/mm²), die Standardabweichung 1,57.

Abb. 43 gibt einen zusammenfassenden Überblick der Meßergebnisse beider Versuchstiere wieder. Dabei liegt die größte Kerndichte mit 210 von 307 in den Klassen 6 - 9, was einen Anteil von 68,40 % in den Bereichen 3,5 - 6,3 ergibt. Bei einer Standardabweichung von 1,72 liegt die mittlere Kerndichte demnach mit 497/mm² nicht signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Das Auftreten höherer Meßwerte bei den Versuchstieren H 14/2 - H 14/8 war schon bei der Auswertung der Kerndichte von Gliazellen der Gruppe 1 und 2 aufgefallen.

In Abb. 44 ist die Zellkerndichte eines 17 - 18 Wochen alten Versuchstieres am 70. Tag p.i. (H 14/6) aufgetragen, wobei 288 Schwarz-Weiß-Positive ausgewertet wurden. Hier ist die höchste Dichte mit 242 von 288 in den Klassen 4 - 8 zu finden. Insgesamt entfallen auf die Bereiche 2,1 - 5,6 84,03 %, was bei einer Standardabweichung von 1,71 eine Kerndichte von 412/mm² bedeutet.

Abb. 45 zeigt die Zelldichte bei einem 18 - 19 Wochen alten Versuchstier am 77. Tag p.i. (H 14/8). Ausgewertet wurden 142 Fotografien. Die Spitzenstellung nehmen

eindeutig mit 112 von 142 die Klassen 3 - 6 ein. Dies bedeutet 78,87 % in den Bereichen 1,4 - 4,2. Daraus resultiert bei einer Standardabweichung von 1,27 ein Mittelwert von 3,45 (= 345 Zellkerne/mm²).

Abb. 46 faßt die Meßergebnisse der beiden Versuchstiere H 14/6 und H 14/8 zusammen. Folglich ist der größte Anteil von Zellkernen mit 267 bzw. 86 von 430 in den Klassen 4 - 6 bzw. 6 - 8 zu verzeichnen. Dies entspricht mit 82,09 % in den Bereichen von 2,1 - 5,6 bei einer Standardabweichung von 1,61 einem Mittel von 389 Zellkernen/mm². Dieser Wert liegt nicht signifikant unter dem der Versuchstiere H 14/2 und H 14/4 und erreicht in etwa das Niveau der Kontrolltiergruppe ($p < 0,1$).

Die Zellkerndichte eines 22 Wochen alten Versuchstieres am 106. Tag p.i. (H 14/20) zeigt Abb. 47. Von insgesamt 172 Auswertungen entfallen 130 auf die Klassen 3 - 5. Somit liegt der prozentuale Anteil im Bereich von 1,4 - 4,2 bei 75,58 %. Damit ist die mittlere Kerndichte, die bei einer Standardabweichung von 1,21 295/mm² beträgt, ein wenig niedriger als bei den Kontrolltieren ($p < 0,1$).

In Abb. 48 ist die Zelldichte eines 24 - 25 Wochen alten Versuchstieres am 124. Tag p.i. (H 14/28) nach Auswertung von 175 Schwarz-Weiß-Positiven zu sehen. Die höchste Kerndichte mit 77,14 % in den Bereichen 2,1 - 4,9 weisen die Klassen 4 - 7 auf. Daraus ergibt sich bei einer Standardabweichung von 1,36 eine mittlere Zelldichte von 382/mm².

Abb. 49 zeigt die Zellkerndichte bei einem 25 - 26 Wochen alten Versuchstier am 127. Tag p.i. (H 14/30) nach Auswertung von 215 Fotografien. Auch hier liegt die

höchste Kerndichte mit 79,54 % in den Bereichen 2,1 - 4,9 (Klasse 4 - 7). Daraus folgt bei einer Standardabweichung von 1,12 ein Mittelwert von 355 Zellkernen /mm².

Folglich ergibt sich bei der Zusammenfassung der Meßergebnisse der Versuchstiere H 14/28 und H 14/30, die in Abb. 50 aufgetragen ist, ein deutliches Übergewicht in den Klassen 4 - 7. Bei einem prozentualen Anteil von 78,46 % in den Bereichen 2,1 - 4,9 und einer Standardabweichung von 1,24 beträgt die Zellkerndichte im Mittel 367/mm².

Nach Auswertung von 141 Schwarz-Weiß-Positiven zeigt Abb. 51 am 137. Tag p.i. (H 14/37) eines 27 Wochen alten Versuchstieres mit 120 von 141 eine Anhäufung von Zellkernen in den Klassen 3 - 6. Dies entspricht 85,11 % in den Bereichen 1,4 - 4,2. Bei einer Standardabweichung von 1,08 beträgt der Mittelwert 3,08 (= 308 Kerne/mm²).

In Abb. 52 ist die Kerndichte eines 28 Wochen alten Versuchstieres am 145. Tag p.i. (H 14/43) aufgetragen, wobei 200 Bilder ausgewertet wurden. Die größte Zellkerndichte liegt hier mit 70,0 % in den Bereichen 2,1 - 5,6 (Klasse 4 - 8). Der daraus resultierende Mittelwert liegt bei 466 Zellkernen/mm², die Standardabweichung beträgt 1,87.

Abb. 53 zeigt die Kerndichte von Neuronen eines 28 1/2 Wochen alten Versuchstieres am 148. Tag p.i. (H 14/45). Nach Auswertung von 317 Fotografien ist die größte Zellkerndichte mit 190 von 317 in den Klassen 4 - 6 zu erkennen. Demnach entfallen auf die Bereiche 2,1 - 4,2 59,94 %, was bei einer Standardabweichung von 1,57 eine mittlere Kerndichte von 370/mm² ergibt.

Auffällig bei der Auswertung der Kerndichte von Neuronen ist die hohe Standardabweichung, die auch die große Schwankungsbreite der Zellkerndichte von 295/mm² (H 14/20) und 559/mm² (H 14/2) erklärt. Ursache dafür ist das unregelmäßige Auftreten der Nervenzellen auf den auszuwertenden Fotografien. So kommt es vor, daß auf einigen Bildern nur 8 - 15 Nervenzellkerne gezählt wurden, auf anderen aber bis zu 56. Vergleicht man die Kerndichte der Kontrolltiergruppe (348/mm²) mit der des Versuchstieres H 14/45 (370/mm²), bleibt festzustellen, daß eine Veränderung der Neuronenanzahl mit fortschreitender Erkrankungszeit nicht stattfindet ($p < 0,1$).

Tab. 6 und Abb. 54 geben einen zusammenfassenden Überblick über die Kerndichte von Neuronen zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten.

Versuchstier	Alter in Wochen	Tag p.i.	mittlere Zellkerndichte/mm²
H KONA,B,C	29	.	348
H 14/2,4	16-17	61,64	497
H 14/6,8	17-19	70,77	389
H 14/20	22	106	295
H 14/28,30	24-26	124,127	367
H 14/37	27	137	308
H 14/43	28	145	466
H 14/45	28 1/2	148	370

Tab. 6

5.2. Zellkerngröße

Zur Bestimmung der Zellkerngröße kommt das unter 4.3.3. beschriebene Verfahren zur Anwendung.

5.2.1. Gliazellkerne der Gruppe 1

Tab. 7 faßt die bei der Messung der Zellkerngröße von Gruppe 1-Gliazellen gewonnenen Werte zusammen.

Versuchstier	Tag p.i.	Mittlerer Kernumfang (µm)	Mittlerer Kerndurchmesser (µm)	Standardabweichung
H KONA		19,53	6,22	3,07
H KONB		19,64	6,25	2,76
H KONC		19,30	6,14	3,08
H KONA,B,C		19,48	6,20	2,97
H 14/2	61	19,86	6,32	2,64
H 14/4	64	19,76	6,29	2,97
H 14/2,4	61,64	19,81	6,31	2,81
H 14/6	70	20,51	6,53	2,65
H 14/8	77	19,82	6,31	2,57
H 14/6,8	70,77	20,16	6,42	2,63
H 14/20	106	18,43	5,87	1,92
H 14/28	124	17,74	5,65	1,62
H 14/30	127	19,86	6,32	2,09
H 14/28,30	124,127	18,81	5,99	2,15
H 14/37	137	18,25	5,81	1,76
H 14/43	145	19,30	6,14	2,07
H 14/45	148	20,53	6,54	2,21

Tab. 7

Bei Betrachtung der Meßergebnisse fällt auf, daß auch zu unterschiedlichen Erkrankungszeitpunkten der Versuchstiere relativ einheitliche Werte bezüglich des Kernumfangs und Kerndurchmessers ermittelt wurden. So liegt der Umfang der Gliazellkerne bei den meisten Tieren zwischen 17 und 20 µm, der Durchmesser folglich zwischen 5,6 und 6,5 µm.

Vergleicht man den mittleren Kerndurchmesser der Kontrolltiergruppe (= 6,20 µm) und H 14/45 (= 6,54 µm), so ist kein Größenunterschied feststellbar ($p < 0,1$). Somit kann davon ausgegangen werden, daß sich die Zellkerngröße von Gliazellen der Gruppe 1 mit fortschreitender Erkrankungsdauer nicht wesentlich ändert.

Abb. 55 stellt den mittleren Kernumfang von Gliazellen der Gruppe 1 zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten graphisch dar.

5.2.2. Gliazellkerne der Gruppe 2

Tab. 8 faßt die bei der Messung der Zellkerngröße von Gruppe 2-Gliazellen gewonnenen Werte zusammen.

Versuchstier	Tag p.i.	Mittlerer Kernumfang (µm)	Mittlerer Kerndurchmesser (µm)	Standardabweichung
H KONA		15,48	4,93	1,98
H KONB		15,64	4,98	2,76
H KONC		14,26	4,54	2,40
H KONA,B,C		15,13	4,82	2,47
H 14/2	61	15,53	4,94	2,03
H 14/4	64	14,73	4,69	1,98
H 14/2,4	61,64	15,13	4,82	2,04
H 14/6	70	15,76	5,02	1,81
H 14/8	77	15,88	5,06	1,95
H 14/6,8	70,77	15,82	5,04	1,88
H 14/20	106	15,88	5,06	1,70
H 14/28	124	14,93	4,75	1,63
H 14/30	127	16,67	5,31	1,91
H 14/28,30	124,127	15,80	5,03	1,98
H 14/37	137	15,90	5,06	1,82
H 14/43	145	17,24	5,49	1,90
H 14/45	148	17,66	5,62	2,19

Tab. 8

Die Gliazellen der Gruppe 2 weisen im wesentlichen einen mittleren Kernumfang von 15 - 17 µm und einen mittleren Kerndurchmesser von 4,5 - 5,5 µm auf.

Ganz allgemein ist auffällig, daß der Kernumfang und damit auch der Kerndurchmesser von Gruppe 2-Gliazellen um 2 - 3 µm kleiner ist als der von Gruppe 1-Gliazellen.

Abb. 56 stellt den mittleren Kernumfang von Gliazellen der Gruppe 2 zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten graphisch dar.

5.2.3. Neurone

Tab. 9 faßt die bei der Messung der Zellkerngröße von Neuronen gewonnenen Werte zusammen.

Versuchstier	Tag p.i.	Mittlerer Kernumfang (µm)	Mittlerer Kerndurchmesser (µm)	Standardabweichung
H KONA		37,27	11,86	3,99
H KONB		43,50	13,85	5,87
H KONC		38,00	12,10	4,99
H KONA,B,C		39,54	12,59	5,70
H 14/2	61	36,22	11,53	5,84
H 14/4	64	35,53	11,31	3,72
H 14/2,4	61,64	35,87	11,42	4,89
H 14/6	70	34,71	11,05	3,58
H 14/8	77	39,75	12,65	3,07
H 14/6,8	70,77	37,24	11,85	4,18
H 14/20	106	38,16	12,15	3,43
H 14/28	124	34,36	10,94	3,31
H 14/30	127	37,99	12,09	3,83
H 14/28,30	124,127	36,17	11,51	4,01
H 14/37	137	37,52	11,94	2,84
H 14/43	145	37,41	11,91	3,29
H 14/45	148	37,58	11,96	3,44

Tab. 9

Die Neurone weisen im wesentlichen einen mittleren Kernumfang von 35 - 40 µm und einen mittleren Kerndurchmesser von 11 -12,5 µm auf. Die Standardabweichung liegt mit 3,07 - 5,87 sehr hoch. Dies kann mit den stark variierenden Größen der Zellkerne und der Neurone selbst

erklärt werden. So wurden z.B. bei den Versuchstieren H 14/2,4 unterschiedliche Kerngrößen von 26 - 78 µm gemessen. Vergleicht man den Kerndurchmesser der Kontrolltiergruppe (12,59 µm) mit dem der Versuchstiere H14/8 (12,65 µm) und H 14/45 (11,96 µm), so kann festgestellt werden, daß mit fortschreitender Erkrankungsdauer eine Veränderung der Zellkerngröße von Neuronen nicht ermittelbar ist ($p < 0,05$).

Abb. 57 stellt den mittleren Kernumfang der Neurone zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten graphisch dar.

5.3. Flächen-Formfaktoren

Tab. 10 und Abb. 58 fassen die Mittelwerte der Flächen-Formfaktoren bei Bestimmung der Zellkerngröße von Gruppe 1- und Gruppe 2-Gliazellen sowie von Neuronen zusammen.

Versuchstier	Tag p.i.	Flächen-Formfaktoren Gruppe 1-Glia	Gruppe 2-Glia	Neurone
H KONA		0,988	0,984	0,994
H KONB		0,987	0,977	0,992
H KONC		0,984	0,976	0,992
H KONA,B,C		0,986	0,979	0,993
H 14/2	61	0,988	0,983	0,989
H 14/4	64	0,989	0,985	0,993
H 14/2,4	61,64	0,989	0,984	0,991
H 14/6	70	0,987	0,982	0,993
H 14/8	77	0,990	0,985	0,995
H 14/6,8	70,77	0,989	0,984	0,994
H 14/20	106	0,988	0,982	0,995
H 14/28	124	0,990	0,985	0,994
H 14/30	127	0,989	0,987	0,994
H 14/28,30	124,127	0,990	0,986	0,994
H 14/37	137	0,989	0,988	0,995
H 14/43	145	0,990	0,988	0,995
H 14/45	148	0,989	0,985	0,995

Tab. 10

Aus Tab. 10 und Abb. 58 geht hervor, daß die mittleren Flächen-Formfaktoren aller drei Zellkerntypen während der gesamten Erkrankungsdauer hinweg konstant bleiben ($p < 0,01$). Dabei weisen die Kerne der Neurone mit Werten von 0,991 - 0,995 bei einer Standardabweichung von 0,004 - 0,017 die stabilsten Formen auf ($p < 0,01$), da sie nur wenig unter dem Idealfaktor von 1,0 liegen. Etwas geringer stellen sich die mittleren Flächen-Formfaktoren für die Gliazellkerne der Gruppe 1 dar ($p < 0,05$). Gemessen wurden Werte von 0,986 - 0,990, die Standardabweichung beträgt 0,008 - 0,032. Für die Zellkerne der Gruppe 2-Glia konnten wenig unregelmäßi-

gere Formen ermittelt werden. So liegen die Mittelwerte bei einer Standardabweichung von 0,011 - 0,033 hier mit 0,979 - 0,988 nur geringfügig unter denen der Gruppe 1-Glia. Vergleicht man die Werte der Kontrolltiergruppe mit denen der Versuchstiere im finalen Stadium der Erkrankung, dann ist festzustellen, daß eine Veränderung der äußeren Form der Zellkerne nicht vorliegt ($p < 0,01$).

5.4. Korrekturverfahren

In Tab. 11 sind die nach der Formel von ABERCROMBIE, die unter 4.3.4. beschrieben wurde, korrigierten tatsächlichen Kerndichten von Gliazellen der Gruppe 1 und 2 sowie von Neuronen aufgeführt.

		Mittlere Zellkerndichte/mm²		
Versuchstier	Tag p.i.	Gruppe 1-Glia	Gruppe 2-Glia	Neurone
H KONA,B,C		146	88	124
H 14/2,4	61,64	186	143	189
H 14/6,8	70,77	153	134	145
H 14/20	106	147	130	108
H 14/28,30	124,127	136	154	139
H 14/37	137	91	184	114
H 14/43	145	56	351	173
H 14/45	148	21	393	137

Tab. 11

Abb. 59 zeigt die nach der Korrekturformel von ABERCROMBIE ermittelte tatsächliche Kerndichte von Gliazellen der Gruppe 1 und 2 sowie von Neuronen zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung.

Gliazellkerne der Gruppe 1 weisen bei der Kontrolltiergruppe eine Dichte von 146/mm² auf. Nach einem nicht siginifikanten Anstieg bis zu den Tagen 61 - 64 p.i. gehen die Werte vom 70. - 106. Tag p.i. auf das Ausgangsniveau zurück. Vom 106. Tag p.i. an folgt ein konstanter Abfall der Zellkerndichte, der am 148. Tag p.i. mit 21/mm² sein Minimum hat. Dieser Verlauf entspricht in seiner Tendenz dem Ergebnis der Auswertung der unkorrigierten Zellkerndichten in Abb. 18.

Die Kerndichte der Gruppe 2 - Gliazellen beträgt bei den Kontrolltieren 88/mm². Auch hier findet bis zu den Tagen 61 - 64 p.i. ein nicht siginifkantes Ansteigen der Werte statt. Zum 106. Tag p.i. hin sinkt die Zellkerndichte leicht ab ($p < 0,1$), der Ausgangswert wird jedoch nicht mehr erreicht. Vom 106. - 137. Tag p.i. nimmt die Kerndichte bis zu einem Wert von 184/mm² nicht siginifikant zu. Darauf folgt ein deutlicher Anstieg der Gliazellkerne der Gruppe 2, der am 148. Tag p.i. mit einer Kerndichte von 393/mm² sein Maximum erreicht. Demnach setzt das stark vermehrte Auftreten von Gliazellkernen der Gruppe 2 im Vergleich zu den unkorrigierten Auswertungen in Abb. 36 zum selben Zeitpunkt ein.

Bei den Neuronen liegt die Kerndichte der Kontrolltiergruppe bei 124/mm². Hierbei machen sich die korrigierten Werte besonders stark bemerkbar. Wie aus Abb. 54 ersichtlich ist, beträgt der Vergleichswert bei den unkorrigierten Auswertungen 348/mm². Jedoch ergeben sich vom Verlauf her kaum Differenzen. Außer einem nicht signifikanten Anstieg der Kerndichte bis zu den Tagen 61 - 64 Tag p.i. sowie am 145. Tag p.i. bleiben die Werte etwa auf dem Niveau der ermittelten Zellkerndichten der Kontrolltiere, so daß eine Veränderung der Kernanzahl mit fortschreitender Erkrankungsdauer nicht festzustellen ist ($p < 0,1$).

5.5. Kerndichte der Gesamtglia

Tab. 12 und Abb. 60 stellen die mittlere Kerndichte aller Gliazellen dar, wobei die korrigierten Werte von Gliazellkernen der Gruppe 1 und 2 zusammengefaßt wurden.

Versuchs-tier	Tag p.i.	Mittlere Zellkerndichte/mm² Gruppe 1-Glia	Gruppe 2-Glia	Gesamt-Glia
H KONA,B,C		146	88	234
H 14/2,4	61,64	186	143	329
H 14/6,8	70,77	153	134	287
H 14/20	106	147	130	277
H 14/28,30	124,127	136	154	290
H 14/37	137	91	184	275
H 14/43	145	56	351	407
H 14/45	148	21	393	414

Tab. 12

Ausgehend von einer mittleren Zellkerndichte von 234/mm² bei der Kontrolltiergruppe kommt es zu einem signifikanten Anstieg bei den Versuchstieren H14/2,4. Danach bewegen sich bis zum 137. Tag p.i. (H14/37) die Werte um 280/mm². Sie liegen demnach nicht signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Am 145. und 148. Tag p.i. (H14/43,45) kommt es dann noch einmal zu einem auffallend hohen Anstieg bis zu 414 Zellkernen/mm². Da zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung je wieder der Ausgangswert erreicht wird, kann daraus geschlossen werden, daß es schon zwischen den Tagen 61 und 77 p.i. zu einer Vermehrung der Gesamtglia, zu einer Gliose, die am 145. - 148. Tag p.i. ihren Höhepunkt erreicht, kommt.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine quantitative Studie über den zeitlichen Verlauf der Scrapie-Erkrankung, besonders in den frühen Stadien vor Auftreten der ersten klinischen Symptome, darzulegen. Im Thalamus, einem Kerngebiet, das in den Regelkreisen vegetativer und motorischer Steuerung von Bedeutung ist, sollten Veränderungen von Zahl und Form der Gliazellen und Neurone erfaßt werden. Dies ist deshalb sinnvoll, weil über den Infektionsweg des Agens und über eine möglicherweise vorhandene Zielzelle im ZNS, die von dem Erreger primär geschädigt wird, noch keine endgültigen Forschungsergebnisse vorliegen.

In der Vergangenheit sind erst wenige Arbeiten veröffentlicht worden (HADLOW, 1961; PATTISON et al., 1967; LAMPERT et al., 1971; BARINGER et al., 1978; FRASER, 1979), die sich mit der zahlenmäßigen Erfassung von Gliazellen und Neuronen bei Scrapie-erkrankten Tieren befassen. Nach der experimentellen Übertragung des Scrapie-Agens auf Ziegen berichtet HADLOW 1961 über eine extensive Hypertrophie und eine mäßige Proliferation von Astrozyten. PATTISON und JONES stellten 1967 bei der experimentellen Übertragung auf die Ratte zwar auch eine Hypertrophie der Astrozyten fest, konnten aber ein Ansteigen dieser Zellfraktion nicht bestätigen. Beide Untersuchungen beschränkten sich auf die Astrozyten, die mit einer Cajal-Gold-Imprägnierung, einem aufwendigen und schwierig durchzuführenden Verfahren, dargestellt wurden. Dabei wurde keine Aussage über die anderen glialen Zellfraktionen, über die Zahl der Neurone und den Zeitpunkt erster pathologischer Veränderungen gemacht.

LAMPERT et al. stellten 1971 fünf Monate nach intrazerebraler Infektion von Mäusen mit dem Scrapie-Agens verschieden starke Grade von spongioformen Veränderungen im ZNS fest. Es konnten vakuolisierte Neurone und eine mäßige Proliferation von Astrozyten und Mikrogliazellen beobachtet werden. Perivaskuläre Leukozyteninfiltrate wurden nicht gefunden. Im Elektronenmikroskop waren ein Status spongiosus sowie Veränderungen von Neuronen und von glialen Elementen sichtbar. Diese Veränderungen kamen durch Anschwellen der Zellkerne zustande. Mit fortschreitender Astrozytenproliferation nahm die Anzahl degenerierter Nervenzellen zu.

Ebenfalls nach intrazerebraler Inokulation von Mäusen konnten BARINGER et al. 1978 drei Monate p. i. ein zahlenmäßig schwaches Auftreten von vakuolisierten Neuronen beobachten. Fünf Monate nach Infektion nahm die Anzahl und die Größe dieser vakuolisierten Neurone zu. Außerdem war zu diesem Zeitpunkt eine mäßige Proliferation von Astrozyten feststellbar.

FRASER berichtet 1979 nach intrazerebraler Inokulation mit dem Scrapie-Agens bei der Maus über eine Gliozytose mit starker Abnahme der Neuronenzahl. Darüberhinaus konnte er morphologische Veränderungen der Astrozyten, die sich durch Anschwellen der Kerne mit unregelmäßig gelappten und ovalen Formen äußern, nachweisen. Allerdings konnten diese Ergebnisse nach peripherer Inokulation der Versuchstiere nicht bestätigt werden.

Die Methode der peripheren Inokulation scheint für quantitative und qualitative Untersuchungen im ZNS am meisten geeignet, da sie eine Verletzung des Gehirns ausschließt und sie dem natürlichen Infektionsweg am nächsten kommt. Da alle angeführten Untersuchungen auf der Basis einer intrazerebralen Inokulation beruhen,

ist eine Verletzung von Gliazellen und Neuronen die Regel.

Übereinstimmung mit den Arbeiten der hier genannten Autoren besteht in der Proliferation von Gliazellen mit zunehmender Erkrankungszeit. Jedoch konnte eine Größenzunahme glialer Elemente, wie sie von HADLOW, PATTISON, LAMPERT, BARINGER und FRASER beschrieben wurde, nicht bestätigt werden.

Im Unterschied zur Untersuchung von FRASER aus dem Jahre 1979 kommt es auch nach peripherer Inokulation zu einer deutlichen Reaktion glialer Elemente im Thalamus. Eine zahlenmäßige Abnahme von Neuronen konnte nicht festgestellt werden. Die von FRASER beschriebenen Formveränderungen, speziell von Astrozyten, können weder bestätigt noch widerlegt werden, da die sichere Differenzierung zwischen den einzelnen Gliazellfraktionen mit der HE-Färbung nicht immer möglich war. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FRASER steht die Zunahme der Gesamtglia mit fortschreitender Erkrankungszeit.

Einige Autoren (HADLOW, 1961; MUSETEANU und DIRINGER, 1981) beschreiben das Auftreten von perivaskulären Infiltraten in Hirnen scrapiekranker Tiere. So berichtet HADLOW von einer beträchtlichen Ansammlung von Leukozyten in Hirnen infizierter Ziegen. Allerdings soll dies kein typisches Zeichen von Scrapie-Erkrankungen sein, da er perivaskuläre Infiltrate auch in Hirnen gesunder Tiere gefunden hat. Nach Durchmusterung der Fotografien konnten weder bei erkrankten Tieren noch bei gesunden Kontrolltieren diese beschriebenen Infiltrate entdeckt werden.

Auch die oft beschriebenen vakuolisierten Neurone (LAMPERT et al., 1971 und 1972; BARINGER et al., 1978 und 1979; DICKINSON et al., 1983; CARP et al., 1984) treten offenbar erst in der letzten Phase des präfinalen Stadiums auf und wurden hier nicht erfaßt, da alle Tiere zum Versuchszeitpunkt noch lebten.

Schließlich wird in der Literatur häufig über das Auftreten von amyloiden Plaques berichtet (BRUCE und FRASER, 1981; DICKINSON et al., 1983; MERZ et al., 1983). BRUCE bezeichnet diese zerebralen amyloiden Plaques als pathologisches Merkmal eines mit Scrapie infizierten Tieres. Der Ort der Synthese des amyloiden Proteins in diesen Plaques sowie der Verteilungsmechanismus in bestimmten Hirnarealen ist unbekannt. Jedoch soll die Häufigkeit des Auftretens der Plaques und ihre Verteilung vom Infektionsmodus abhängen. So wurden nach intrazerebraler Injektion amyloide Plaques vermehrt angetroffen, nach peripherer Injektion desselben Agens jedoch nur teilweise oder überhaupt nicht. Darüberhinaus können diese Plaques nur in der Hirnhälfte nachgewiesen werden, in die auch tatsächlich injiziert wurde. Daher erklärt BRUCE das Auftreten der amyloiden Plaques in bestimmten Hirnarealen mit einer erhöhten Scrapie-Infektiosität, die durch den Injektionsort bedingt ist.

Diese Theorie konnte 1983 durch Untersuchungen von DICKINSON et al. bestätigt werden. Auch das von MERZ et al., 1983 nach intrazerebraler Inokulation beschriebene Auftreten von amyloiden Plaques könnte mit der Theorie von BRUCE erklärt werden.

Somit scheint es verständlich, daß bei unseren Untersuchungen keine amyloiden Plaques gefunden werden konnten, da die Versuchstiere ausnahmslos intraperitoneal, also peripher, injiziert wurden.

7. Zusammenfassung

Nach intraperitonealer Inokulation von Hamstern mit dem Scrapie-Agens 263 K konnte im Thalamus der Versuchstiere eine frühe Reaktion glialer Elemente auf die Infektion nachgewiesen werden. Eine Abnahme von Gliazellkernen der Gruppe 1 wurde ab dem 106. Tag p.i. beobachtet, gleichzeitig ist ein Ansteigen der Kerndichte von Gliazellen der Gruppe 2 von diesem Tag an festzustellen. Die Dichte der Neuronenkerne verändert sich im Laufe der Erkrankung nur unauffällig.

Die Zellkerngröße von Gliazellen der Gruppe 1 und Neuronen bleibt über den gesamten Krankheitsverlauf hinweg konstant. Zellkerne von Gliazellen der Gruppe 2 sind durchweg kleiner als die der Gruppe 1-Glia, vergrößern sich jedoch im finalen Stadium.

Die regelmäßigsten Formen der Zellkerne weisen Neurone und Gliazellen der Gruppe 1 auf, Gliazellkerne der Gruppe 2 besitzen unregelmäßigere Formen.

Mit zunehmender Erkrankungszeit kommt es zu einer Gliose, die am 145. - 148. Tag p.i. ihr Maximum erreicht.

8. Anhang

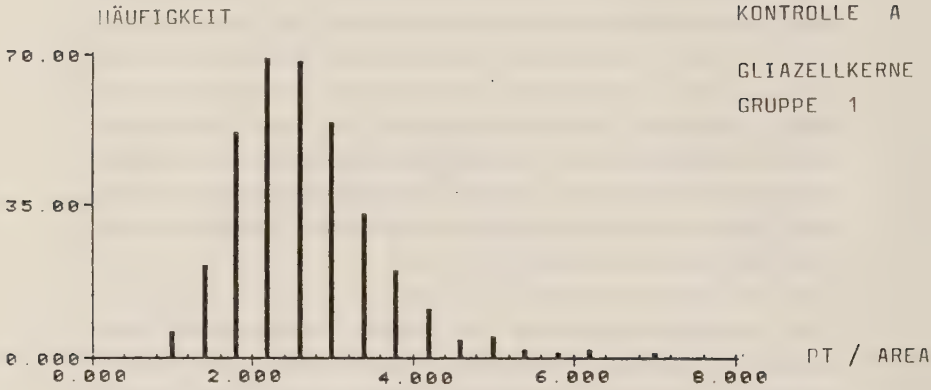

Abb. 1

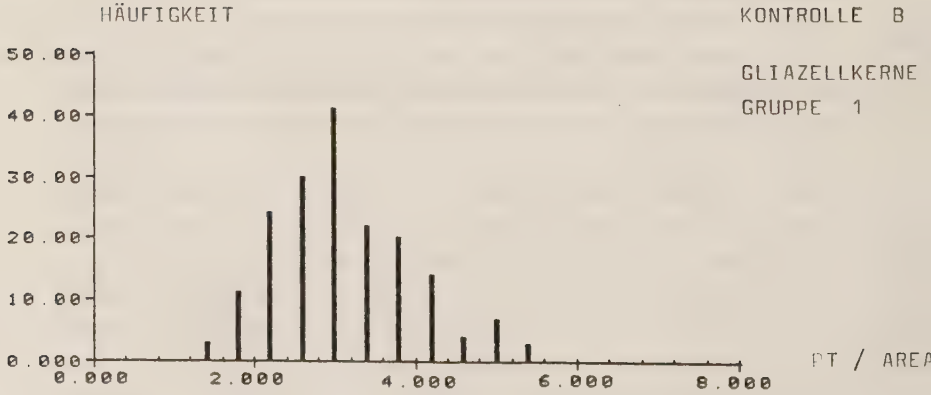

Abb. 2

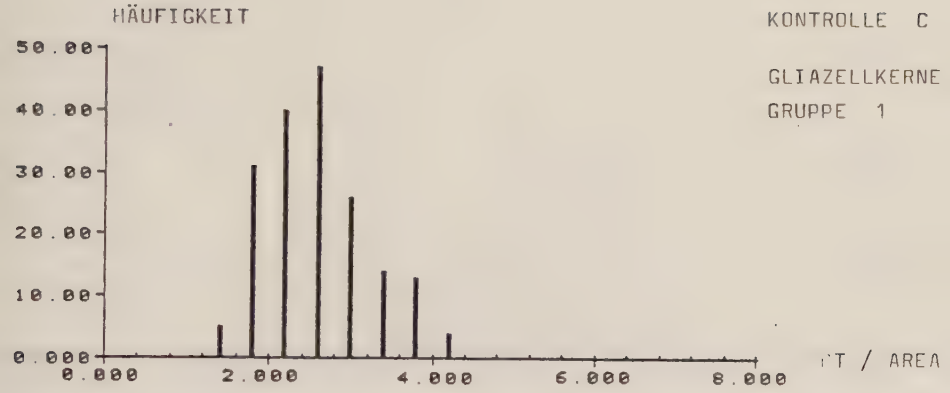
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE C
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
T / AREA

Abb. 3

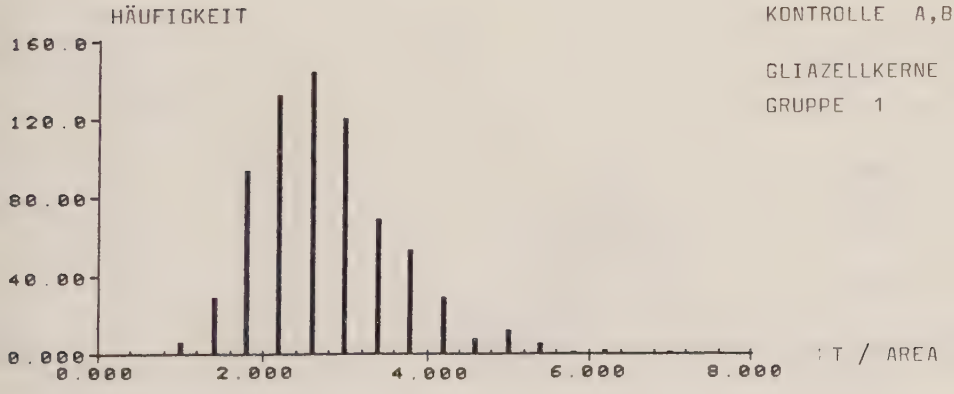
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE A,B
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
160.0
120.0
80.00
40.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
T / AREA

Abb. 4

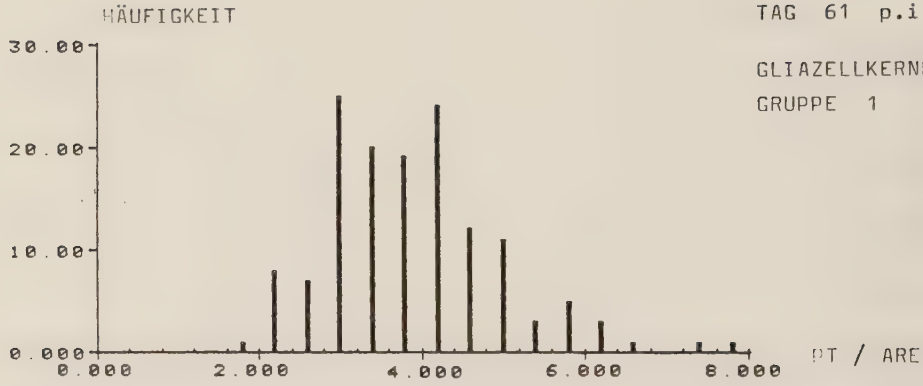
HÄUFIGKEIT
TAG 61 p.i
GLIAZELLKERN
GRUPPE 1
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / ARE

Abb. 5

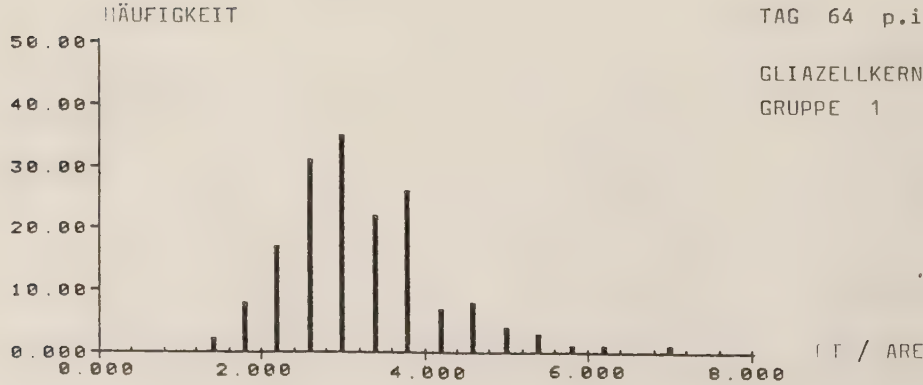
HÄUFIGKEIT
TAG 64 p.i
GLIAZELLKERN
GRUPPE 1
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / ARE

Abb. 6

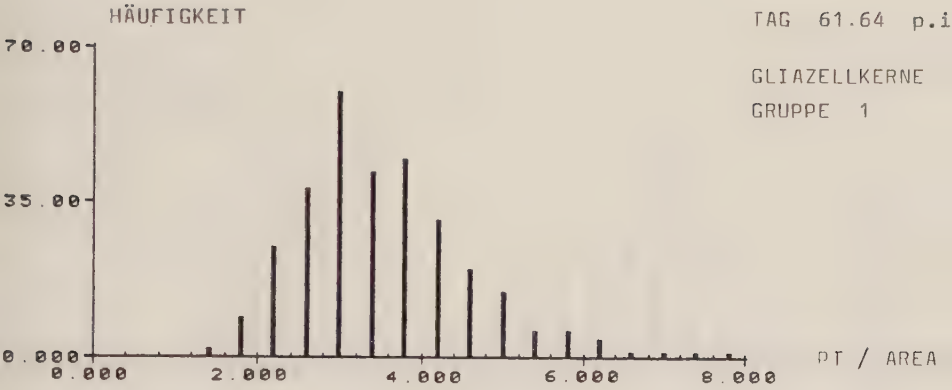
HÄUFIGKEIT
TAG 61.64 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
70.00
35.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 7

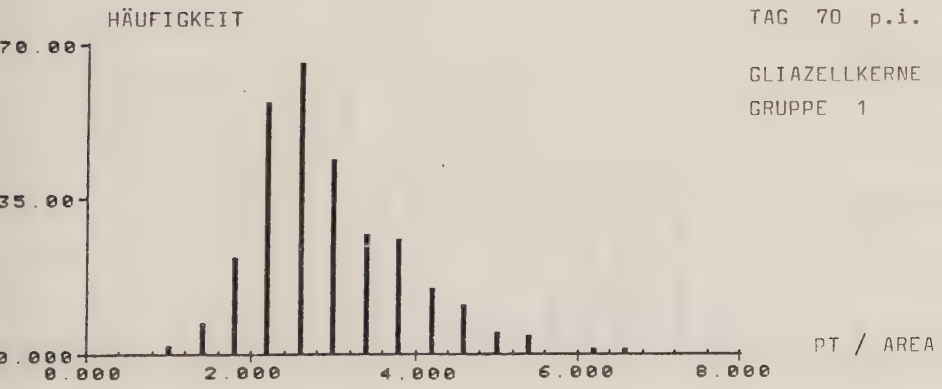
HÄUFIGKEIT
TAG 70 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
70.00
35.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 8

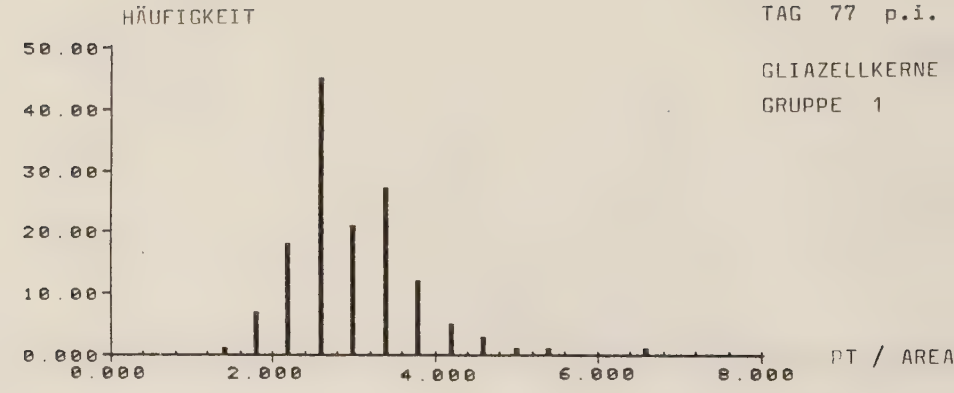
HÄUFIGKEIT
TAG 77 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 9

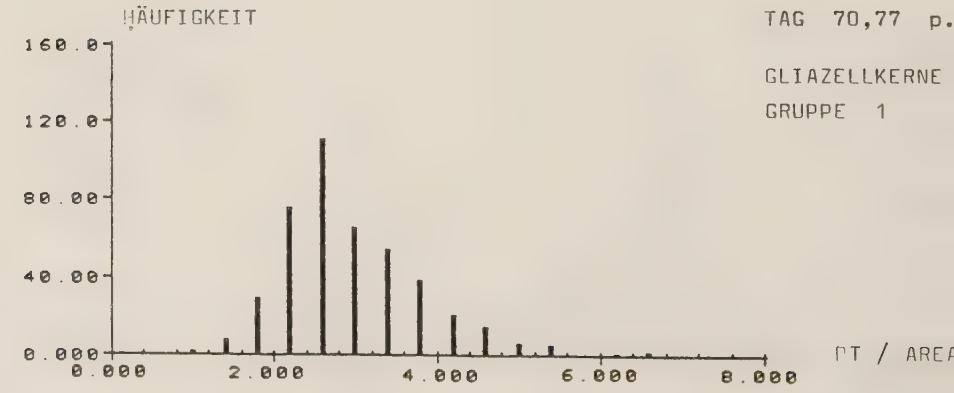
HÄUFIGKEIT
TAG 70,77 p.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
160.0
120.0
80.00
40.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 10

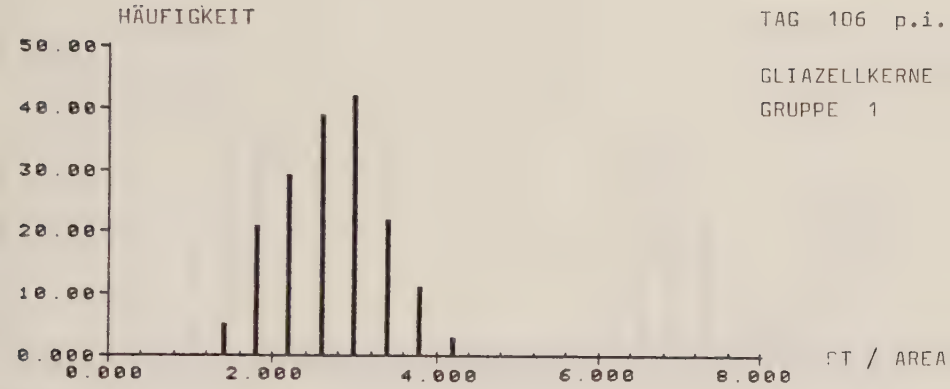
HÄUFIGKEIT
TAG 106 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 11

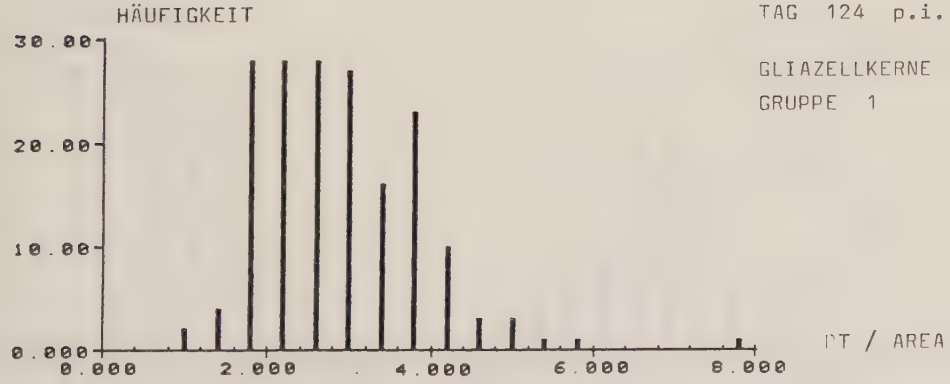
HÄUFIGKEIT
TAG 124 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 12

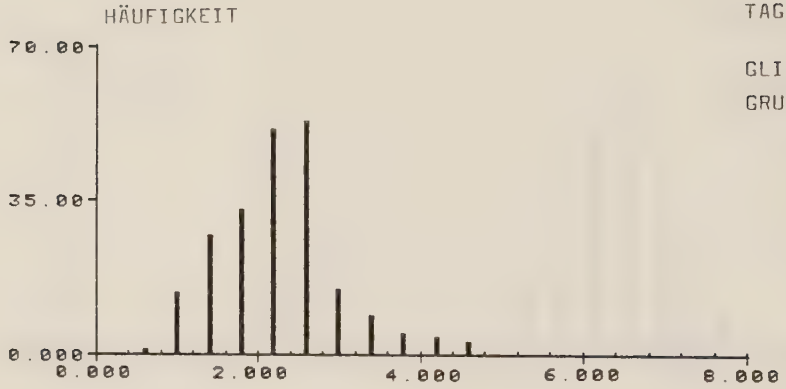
HÄUFIGKEIT
TAG 127 p.i
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
70.00
35.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / ARE

Abb. 13

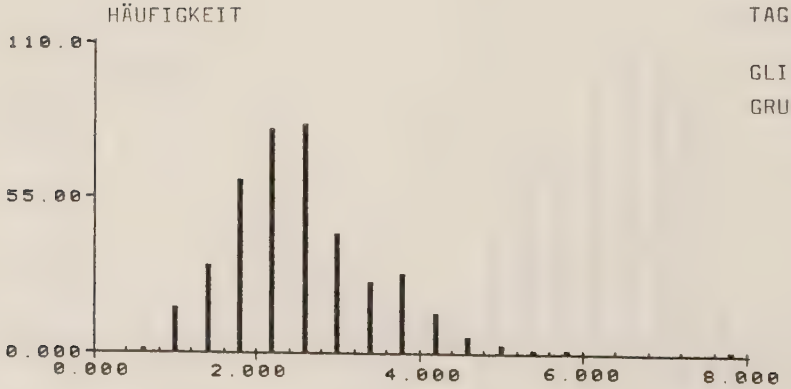
HÄUFIGKEIT
TAG 124,127
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
110.0
55.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / ARE

Abb. 14

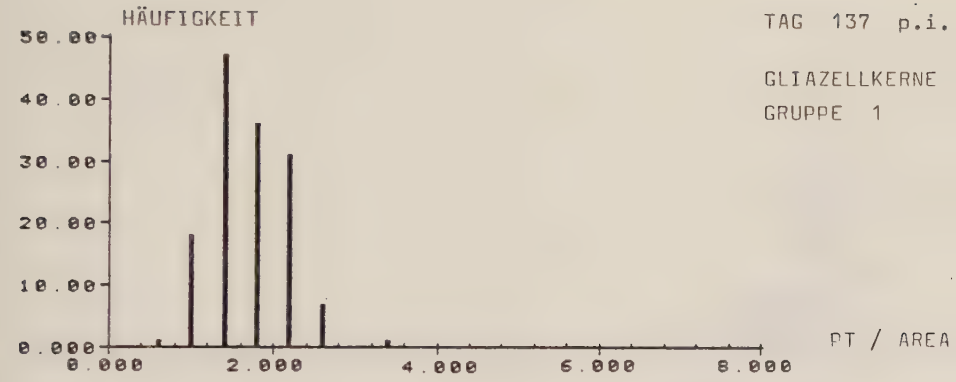
HÄUFIGKEIT
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA
TAG 137 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1

Abb. 15

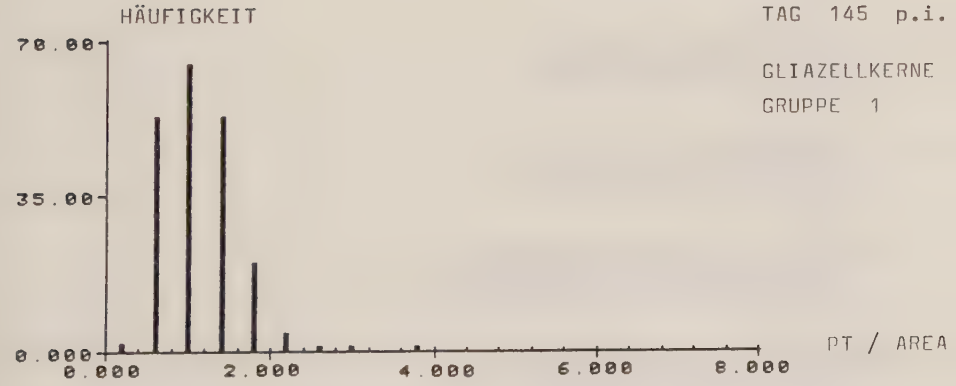
HÄUFIGKEIT
70.00
35.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA
TAG 145 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1

Abb. 16

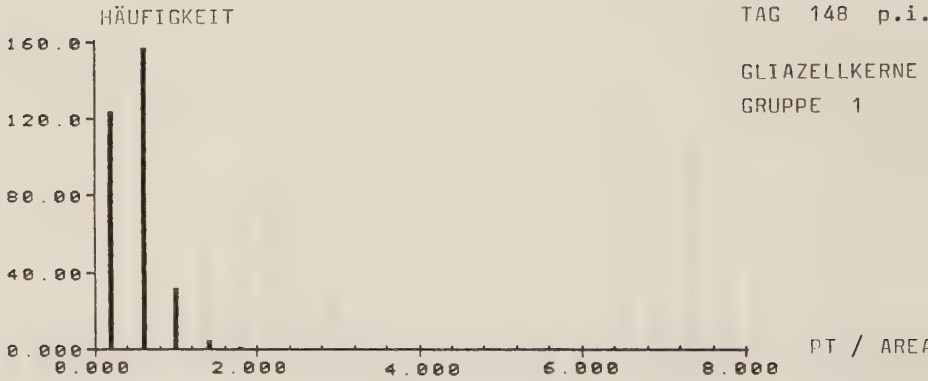
HÄUFIGKEIT
TAG 148 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 1
160.0
120.0
80.00
40.00
0.000
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
PT / AREA

Abb. 17

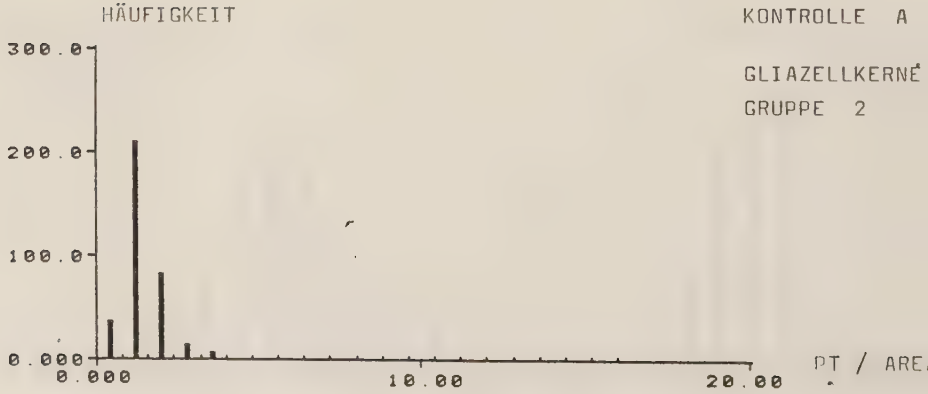
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE A
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
300.0
200.0
100.0
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 19

Gliazellkerne Gruppe 1

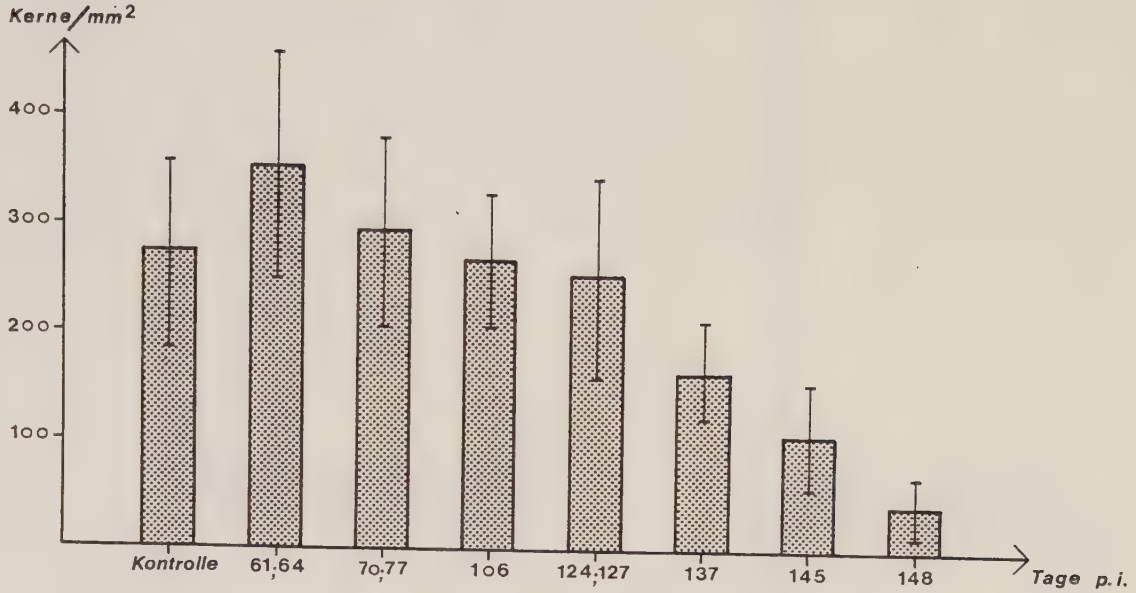

Abb. 18

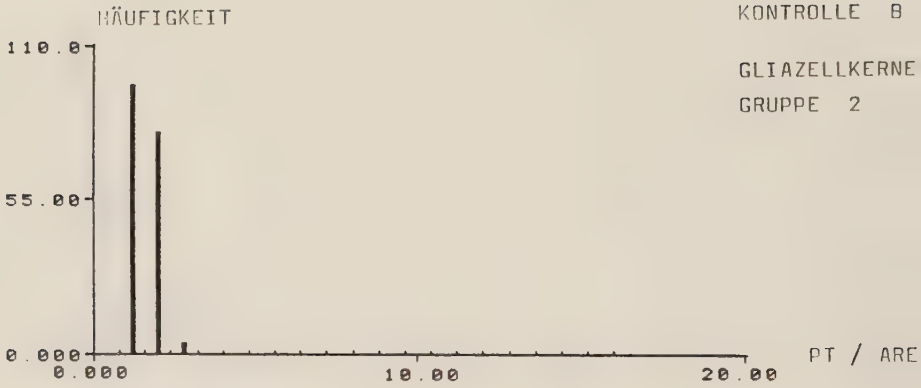
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE B
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
110.0
55.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / ARE

Abb. 20

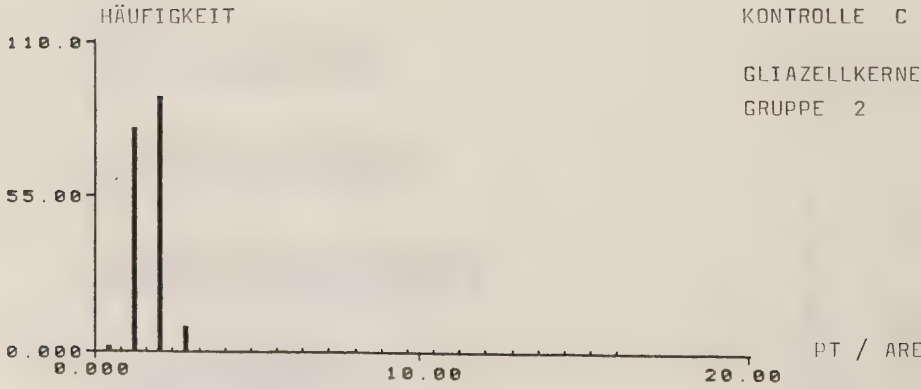
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE C
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
110.0
55.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / ARE

Abb. 21

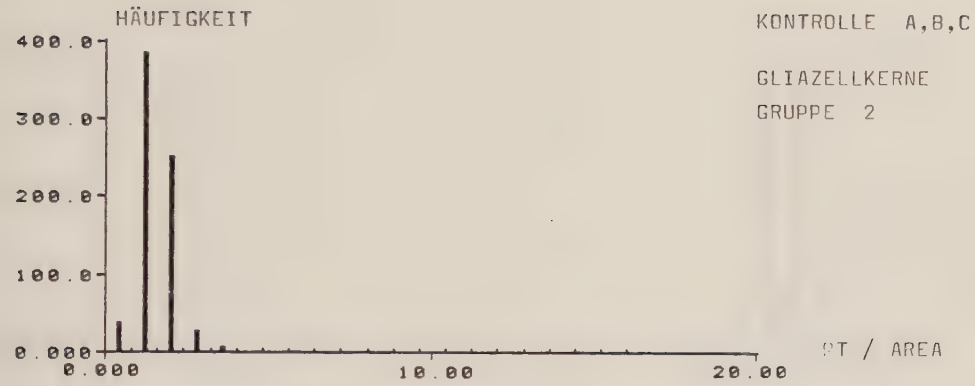
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE A,B,C
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
400.0
300.0
200.0
100.0
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 22

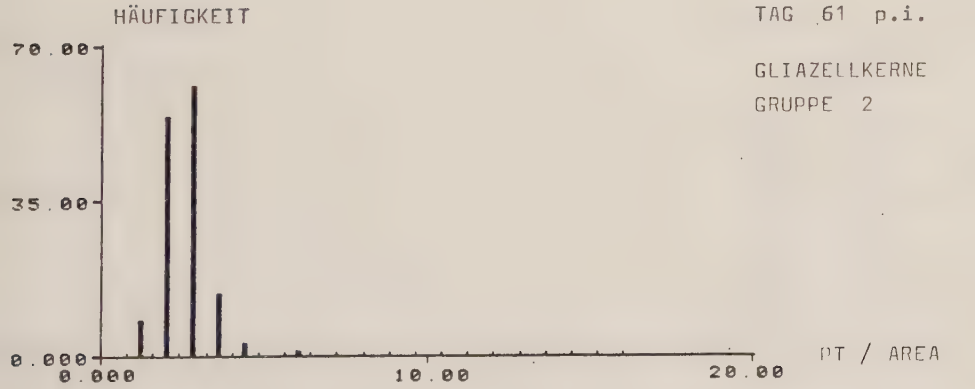
HÄUFIGKEIT
TAG 61 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
70.00
35.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 23

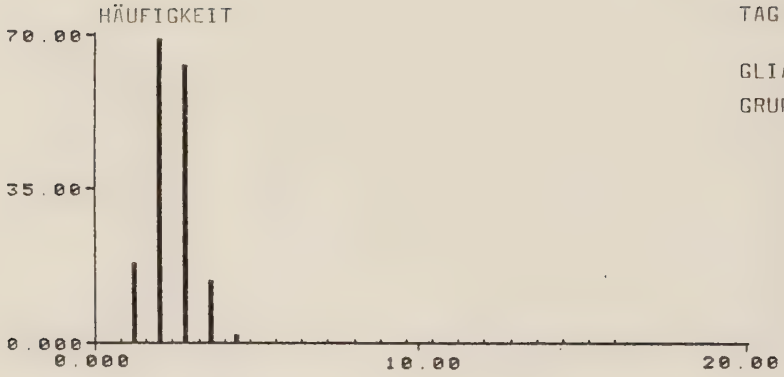
HÄUFIGKEIT
70.00
35.00
0.000
0.000
10.00
20.00
TAG 64 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
PT / AREA

Abb. 24

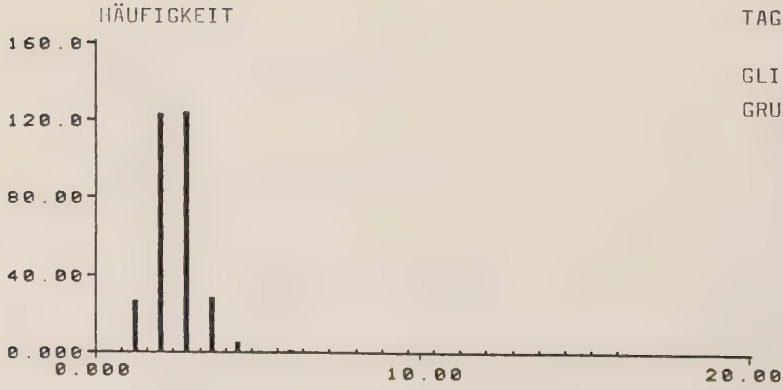
HÄUFIGKEIT
160.0
120.0
80.00
40.00
0.000
0.000
10.00
20.00
TAG 61,64 p.i
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
PT / AREA

Abb. 25

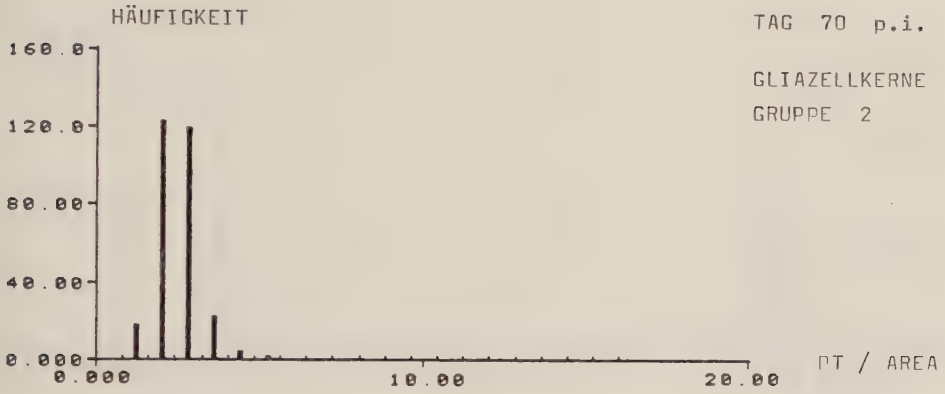
HÄUFIGKEIT
TAG 70 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
160.0
120.0
80.00
40.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 26

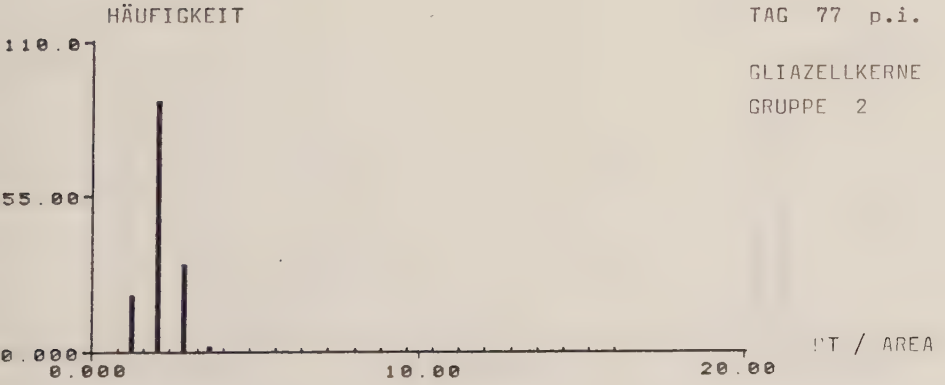
HÄUFIGKEIT
TAG 77 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
110.0
55.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 27

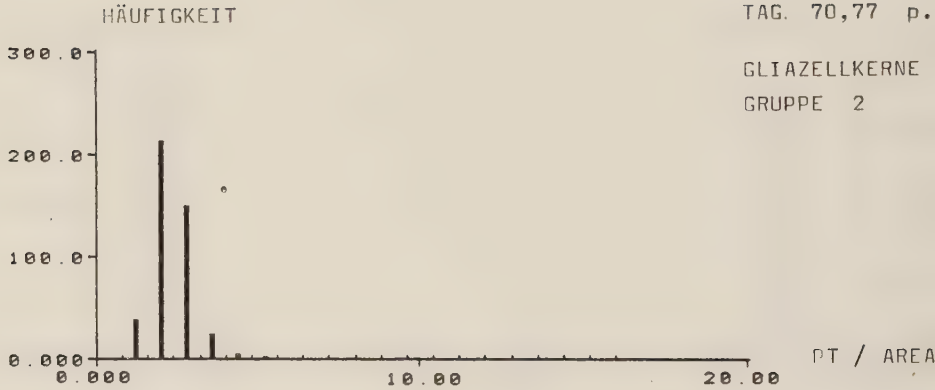
HÄUFIGKEIT
TAG. 70,77 p.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
300.0
200.0
100.0
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 28

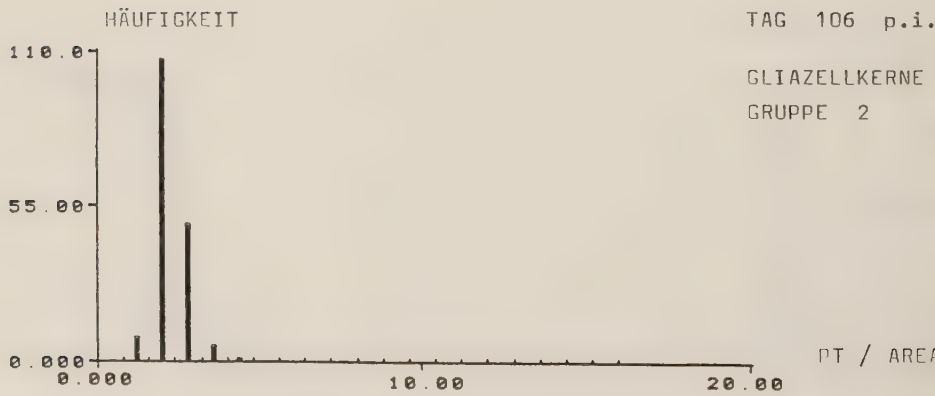
HÄUFIGKEIT
TAG 106 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
110.0
55.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 29

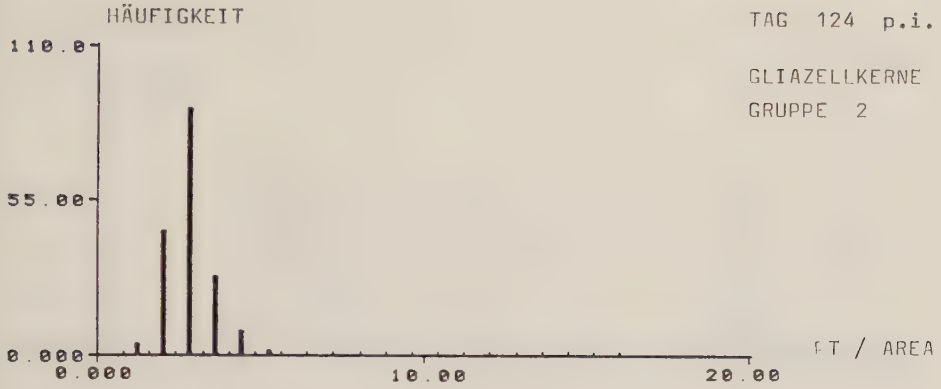
HÄUFIGKEIT
TAG 124 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
110.0
55.00
0.000
0.000
10.00
20.00
FT / AREA

Abb. 30

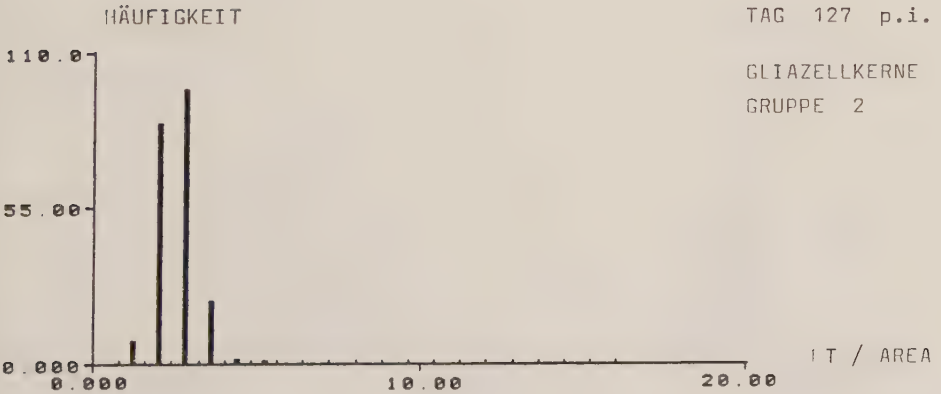
HÄUFIGKEIT
TAG 127 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
110.0
55.00
0.000
0.000
10.00
20.00
FT / AREA

Abb. 31

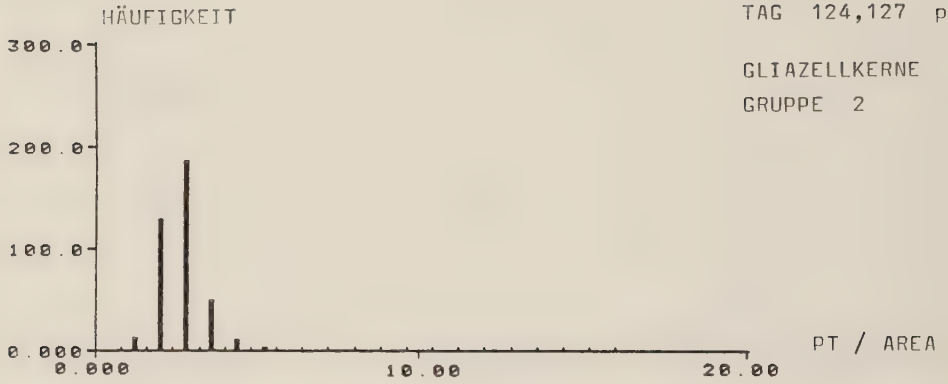
HÄUFIGKEIT
TAG 124,127 p
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
300.0
200.0
100.0
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 32

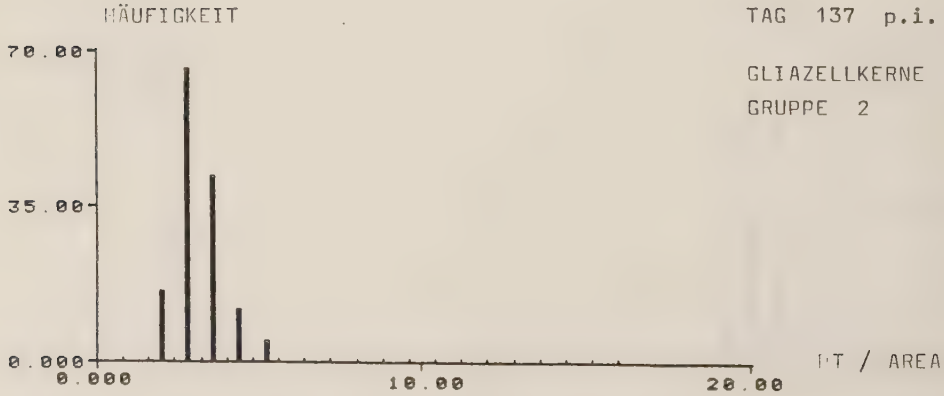
HÄUFIGKEIT
TAG 137 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2
70.00
35.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA

Abb. 33

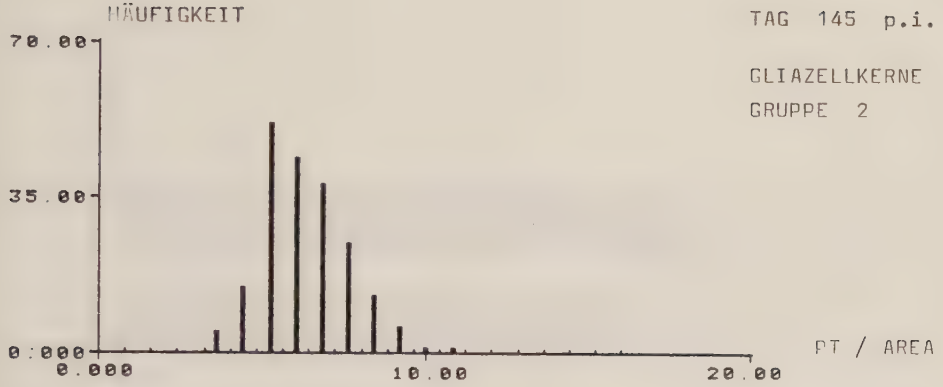
HÄUFIGKEIT
70.00
35.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA
TAG 145 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2

Abb. 34

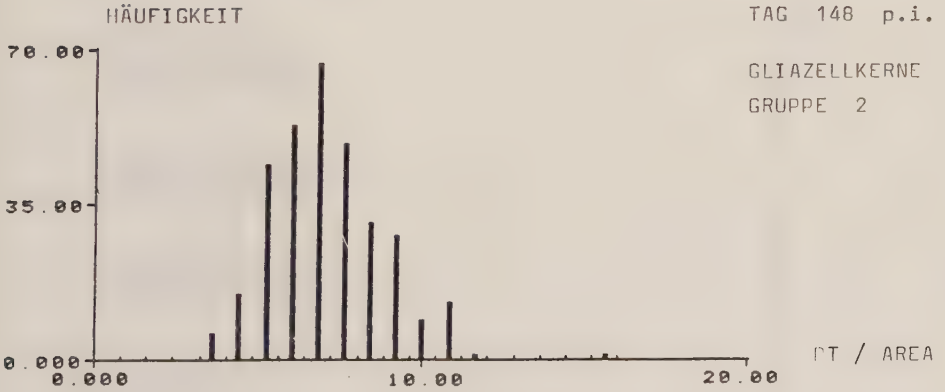
HÄUFIGKEIT
70.00
35.00
0.000
0.000
10.00
20.00
PT / AREA
TAG 148 p.i.
GLIAZELLKERNE
GRUPPE 2

Abb. 35

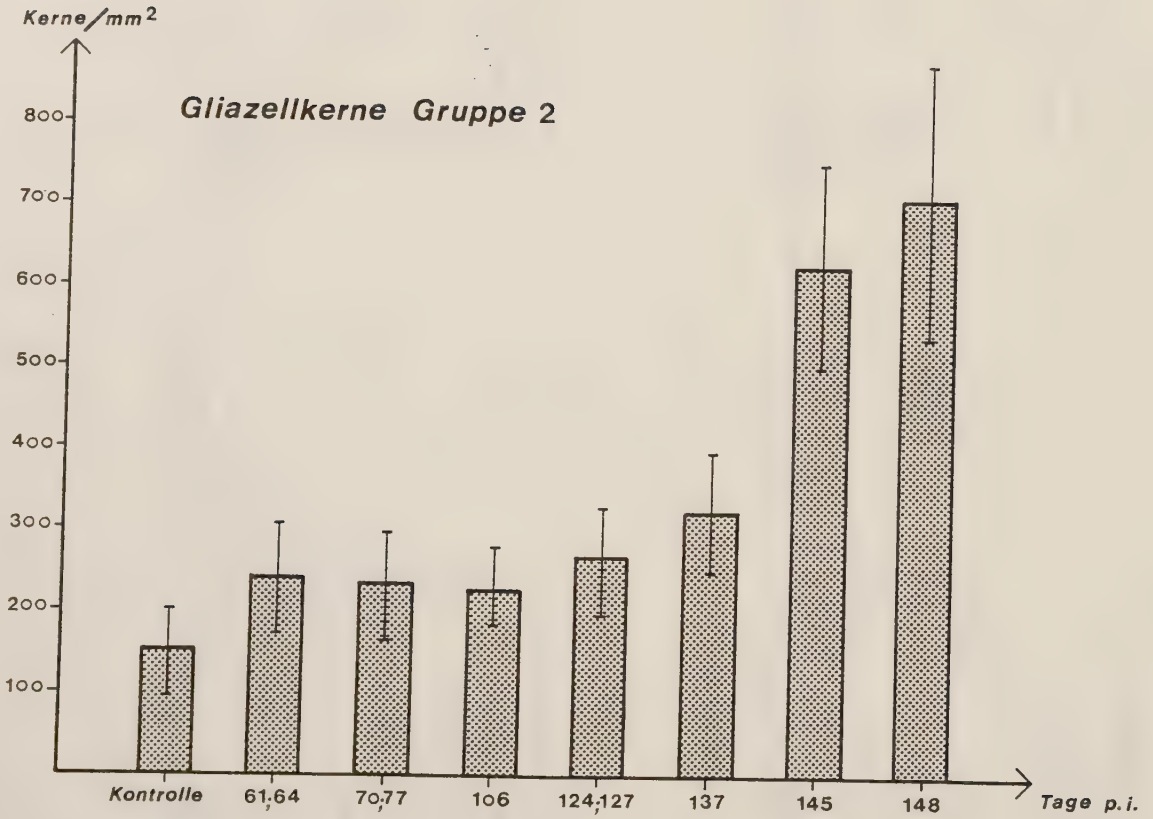
Kerne/mm²
Gliazellkerne Gruppe 2
800
700
600
500
400
300
200
100
Kontrolle
61;64
70;77
106
124;127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 36

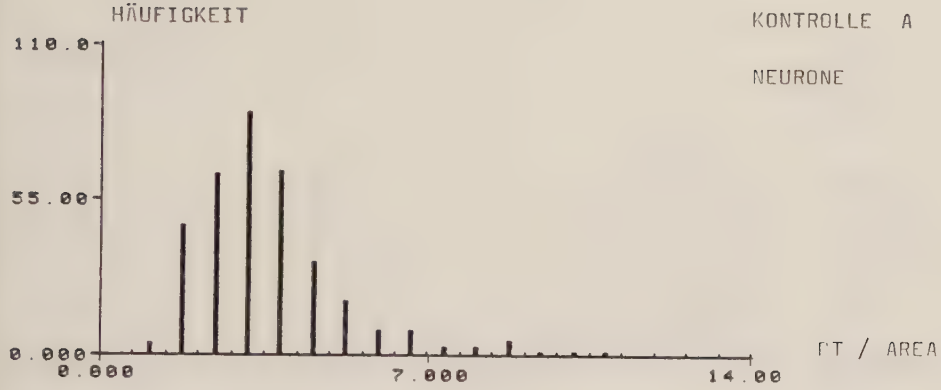
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE A
NEURONE
110.0
55.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 37

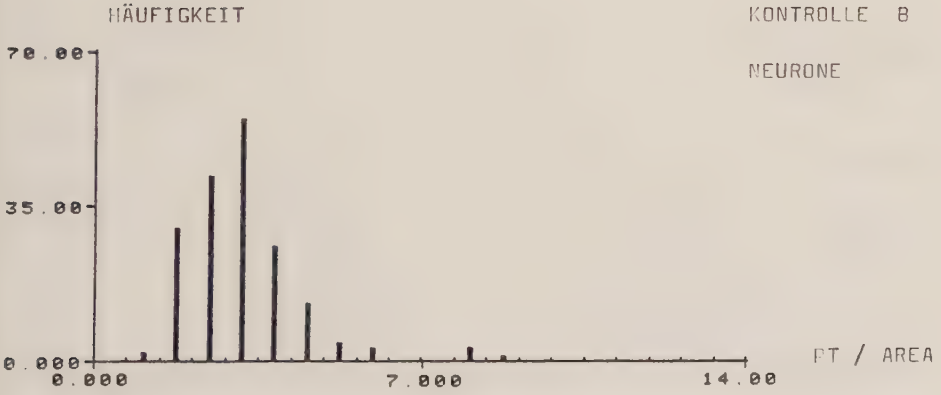
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE B
NEURONE
70.00
35.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 38

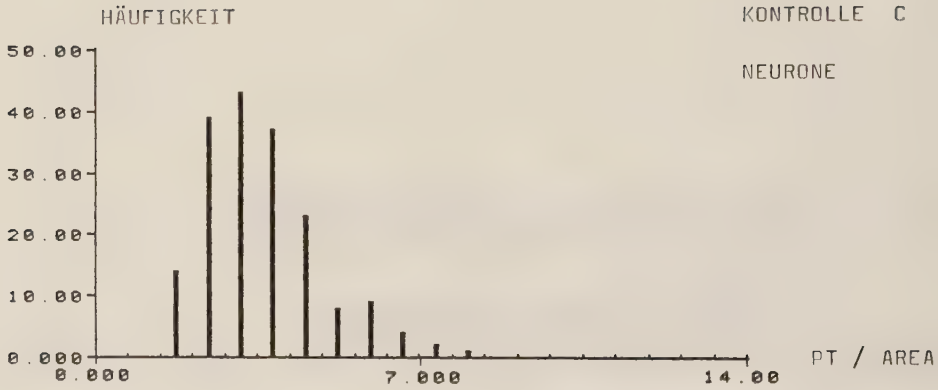
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE C
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 39

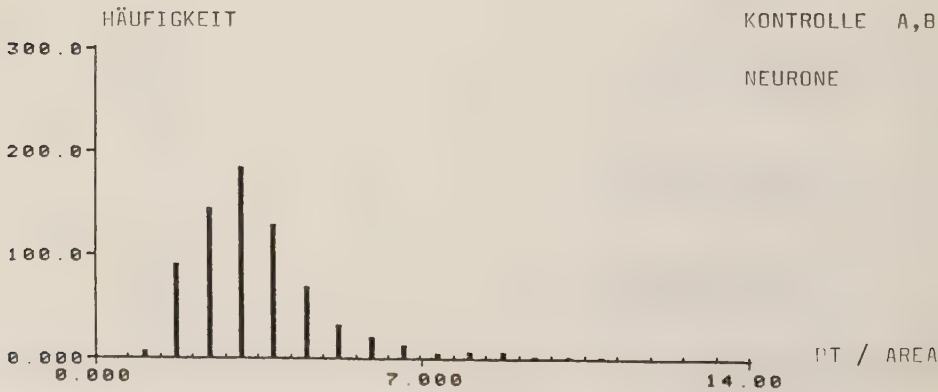
HÄUFIGKEIT
KONTROLLE A,B
NEURONE
300.0
200.0
100.0
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 40

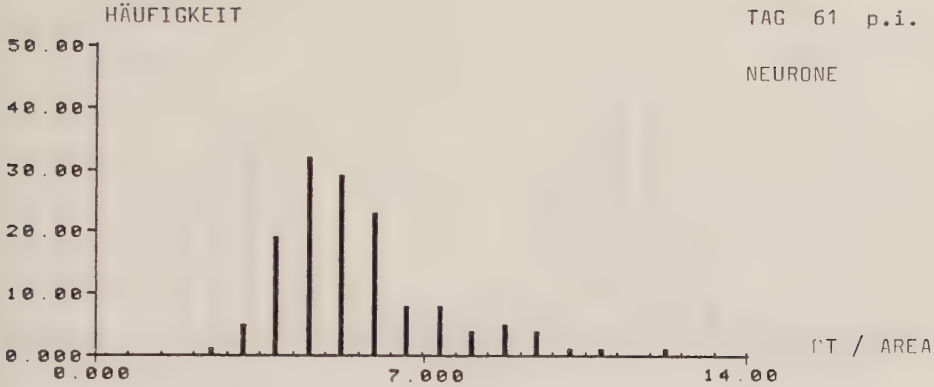
HÄUFIGKEIT
TAG 61 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 41

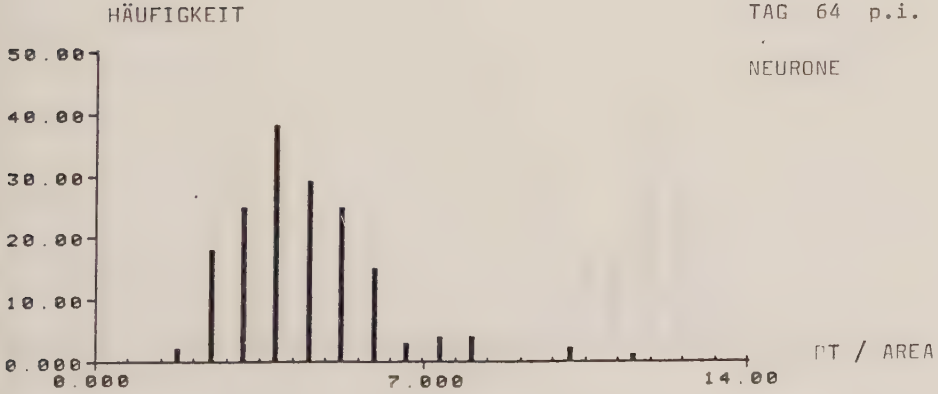
HÄUFIGKEIT
TAG 64 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 42

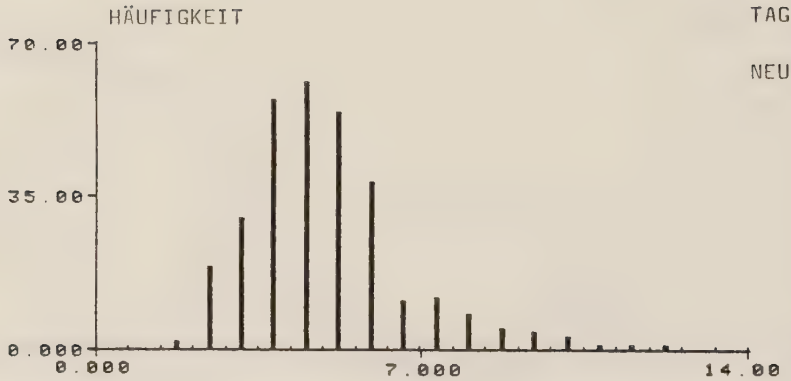
HÄUFIGKEIT
TAG 61,64 p
NEURONE
70.00
35.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / ARE

Abb. 43

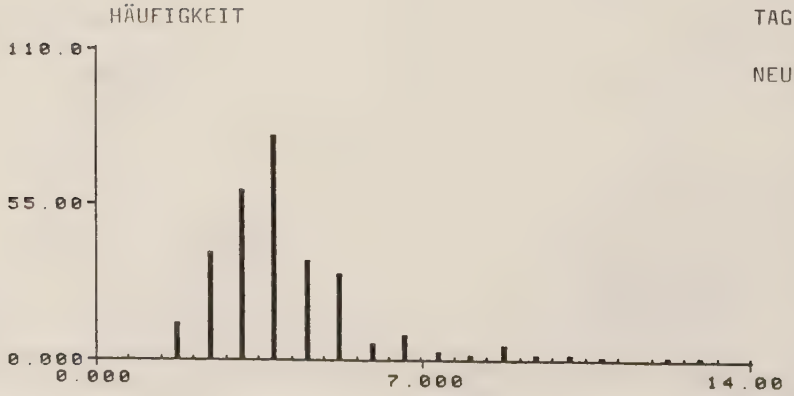
HÄUFIGKEIT
TAG 70 p.i.
NEURONE
110.0
55.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / ARE

Abb. 44

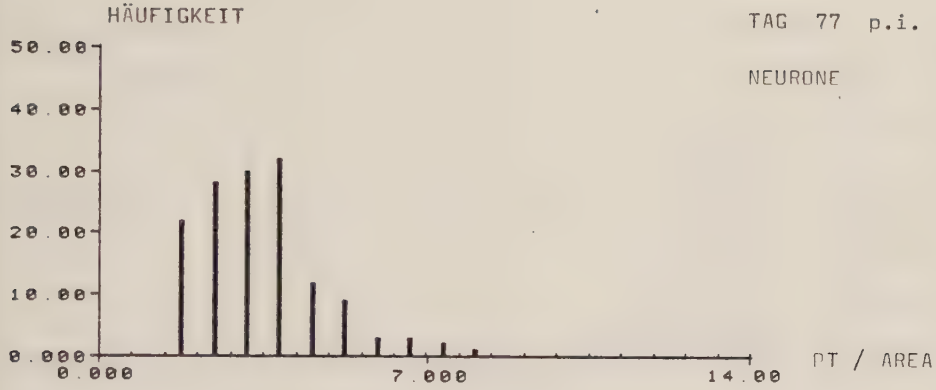
HÄUFIGKEIT
TAG 77 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 45

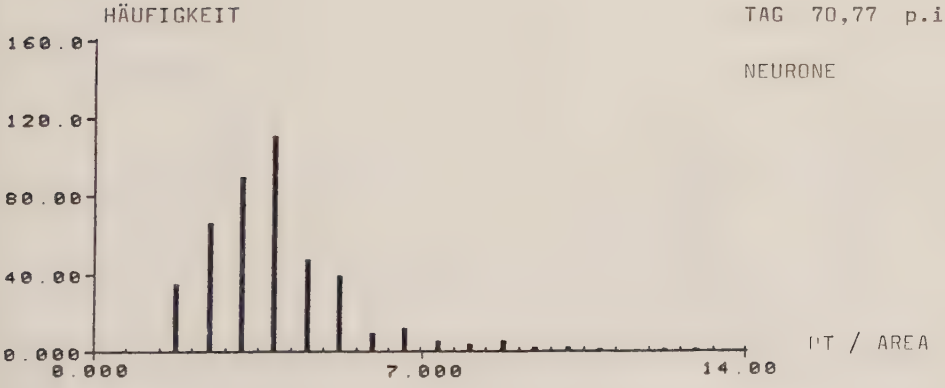
HÄUFIGKEIT
TAG 70,77 p.i.
NEURONE
160.0
120.0
80.00
40.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 46

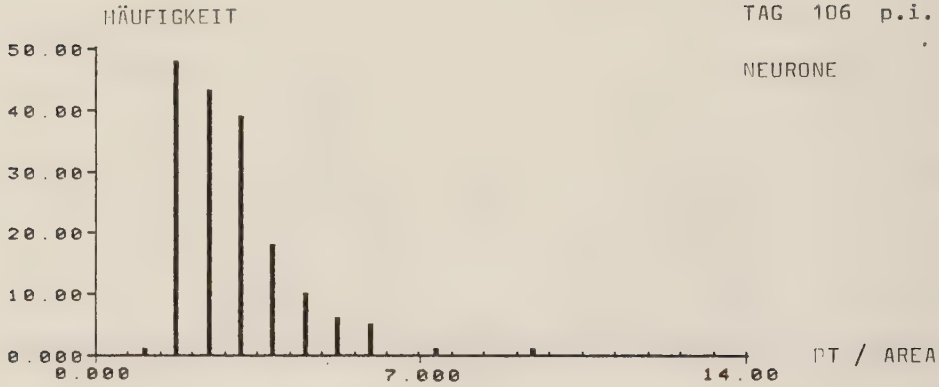
HÄUFIGKEIT
TAG 106 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 47

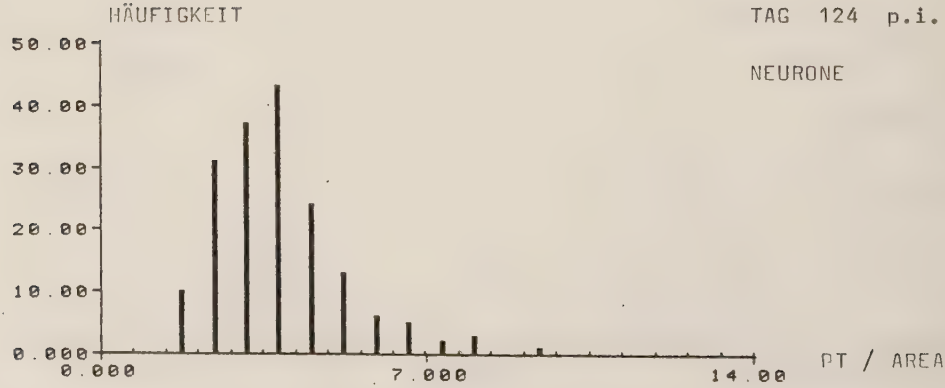
HÄUFIGKEIT
TAG 124 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 48

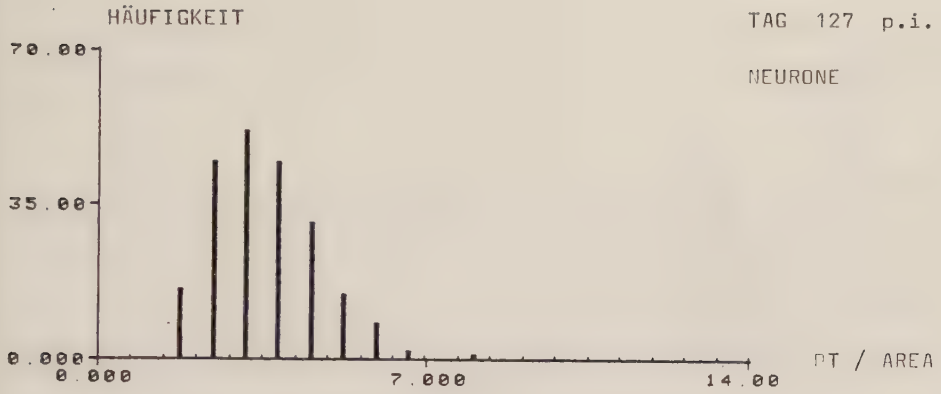
HÄUFIGKEIT
TAG 127 p.i.
NEURONE
70.00
35.00
0.000
0.000
7.000
14.00
DT / AREA

Abb. 49

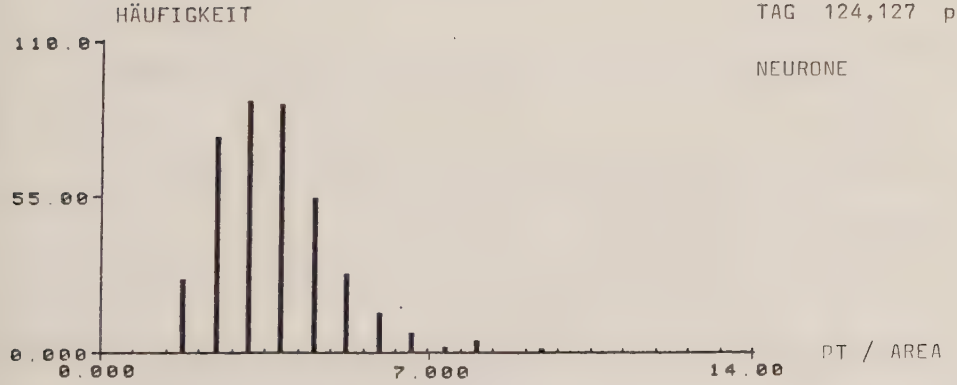
HÄUFIGKEIT
TAG 124,127 p.i
NEURONE
110.0
55.00
0.000
0.000
7.000
14.00
DT / AREA

Abb. 50

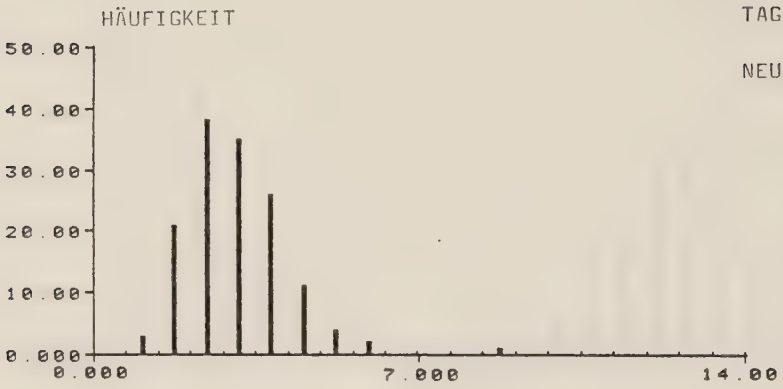
HÄUFIGKEIT
TAG 137 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 51

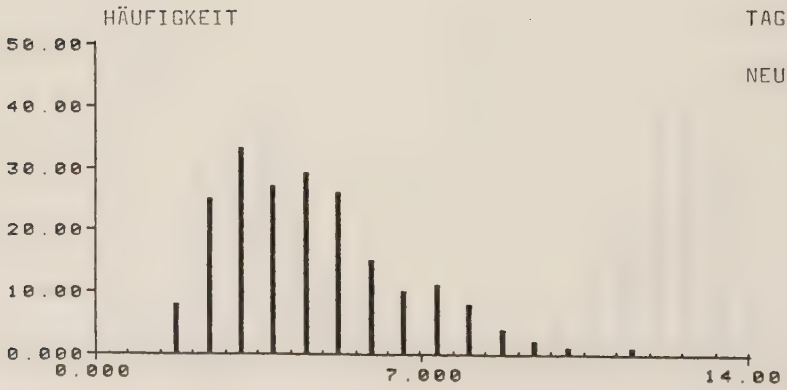
HÄUFIGKEIT
TAG 145 p.i.
NEURONE
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 52

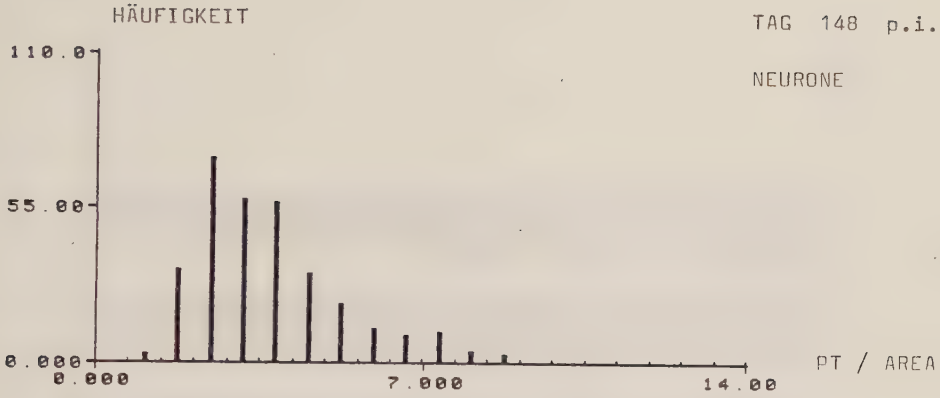
HÄUFIGKEIT
TAG 148 p.i.
NEURONE
110.0
55.00
0.000
0.000
7.000
14.00
PT / AREA

Abb. 53

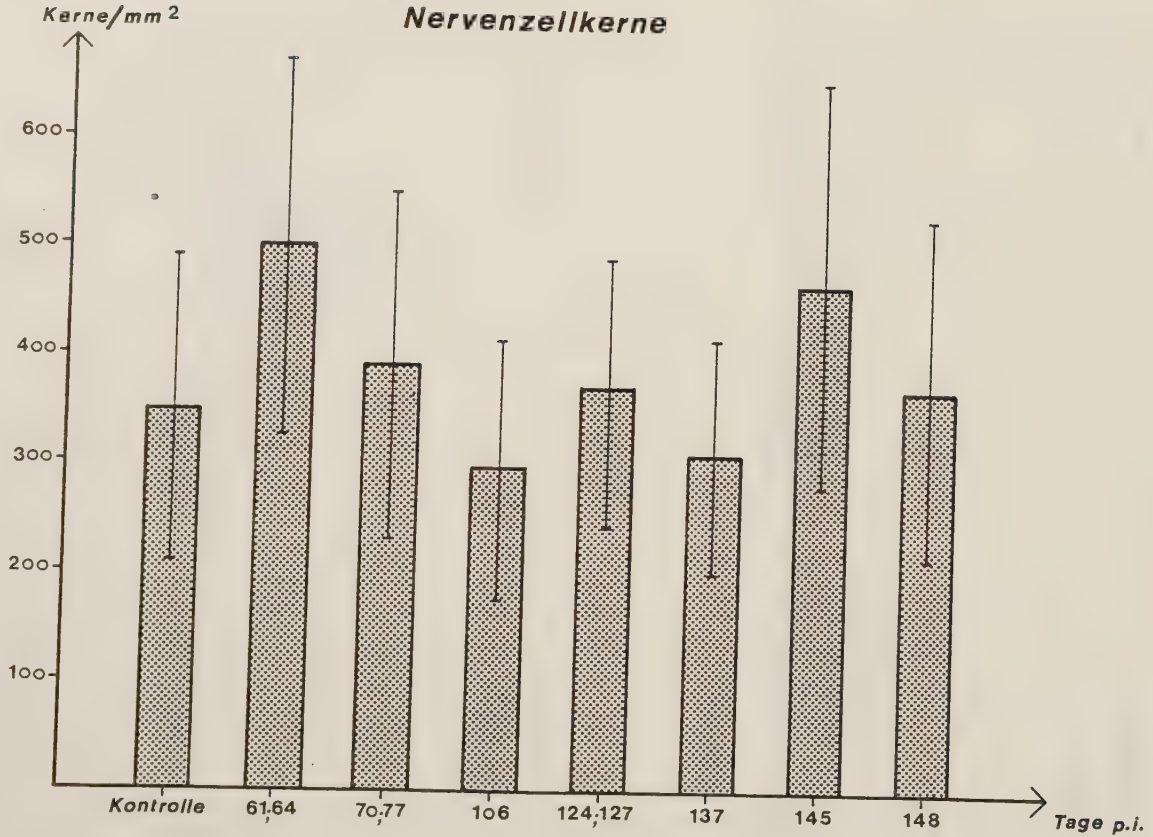
Nervenzellkerne
Kerne/mm 2
600
500
400
300
200
100
Kontrolle
61,64
70,77
106
124,127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 54

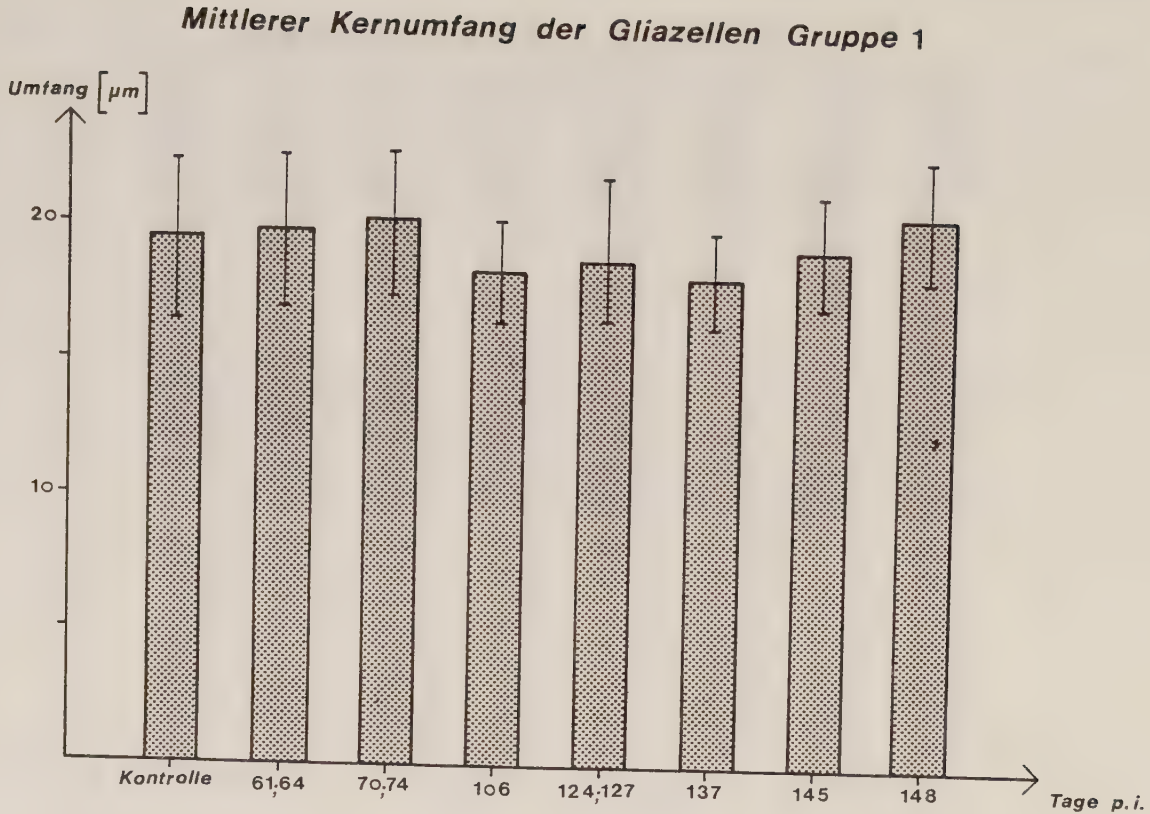
Mittlerer Kernumfang der Gliazellen Gruppe 1
Umfang [µm]
20
10
Kontrolle
61;64
70;74
106
124;127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 55

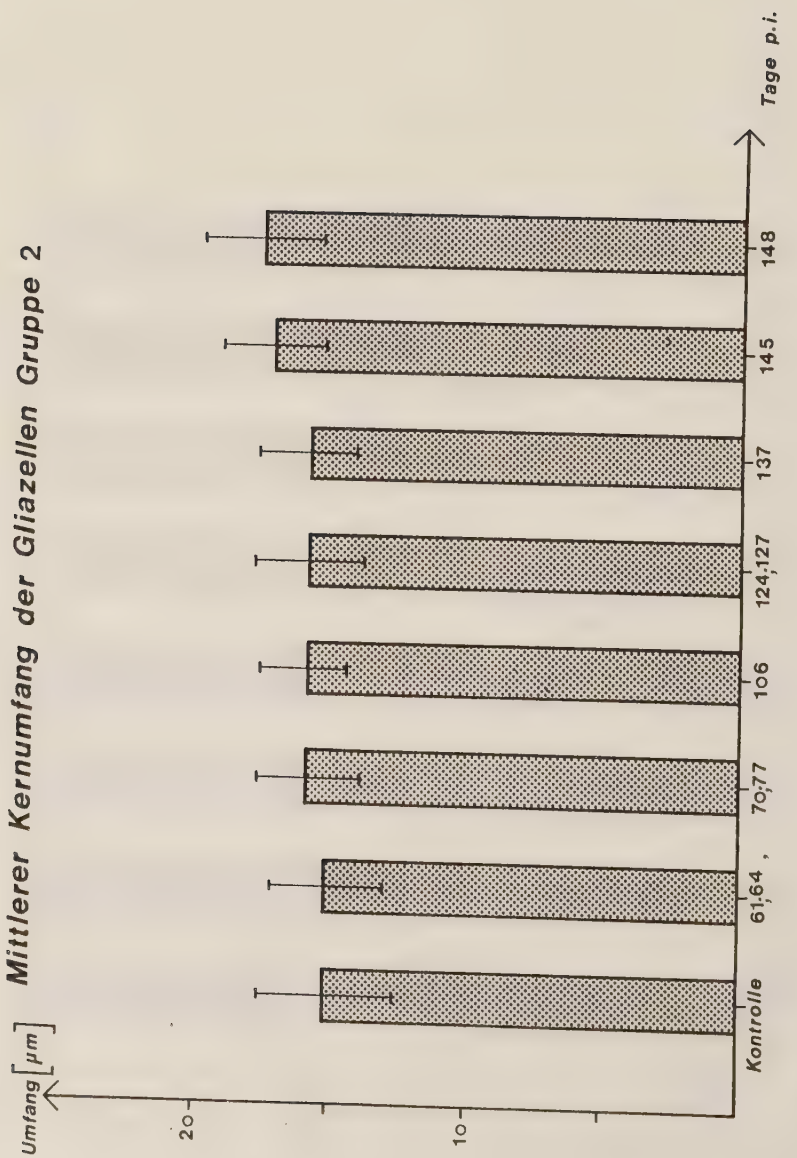
Mittlerer Kernumfang der Gliazellen Gruppe 2
Umfang [µm]
20
10
Kontrolle
61,64
70,77
106
124,127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 56

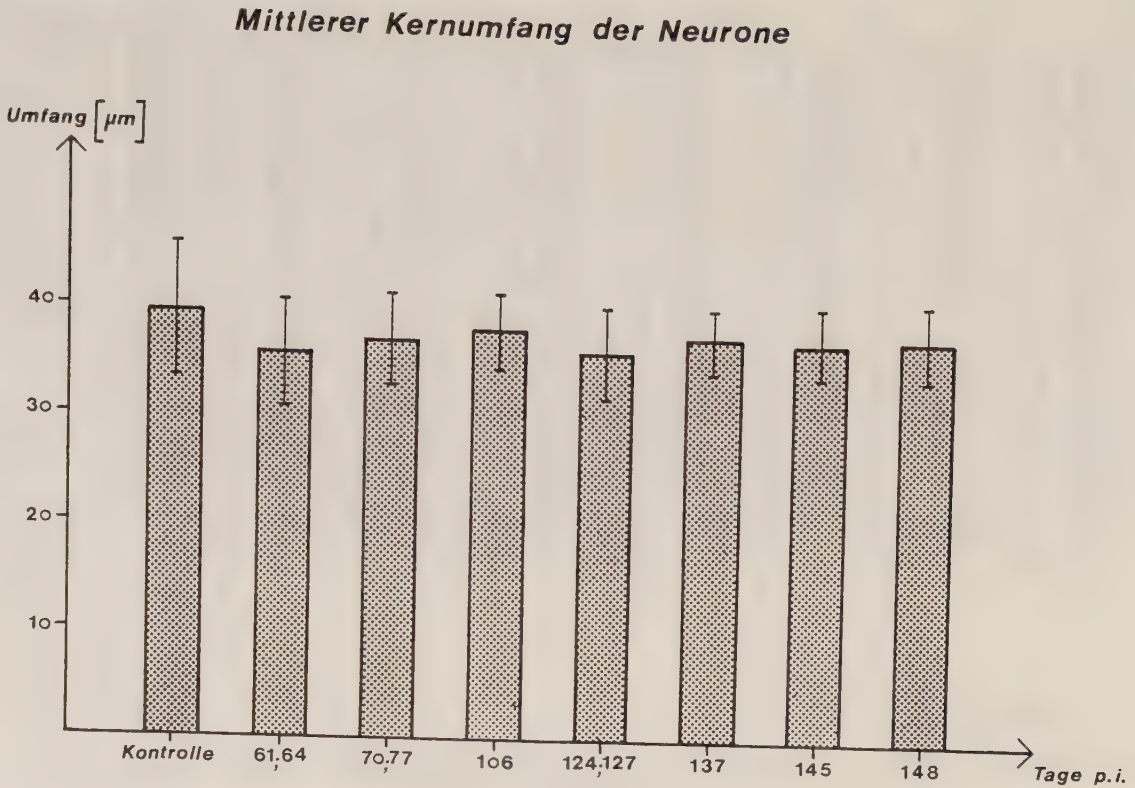
Mittlerer Kernumfang der Neurone
Umfang [µm]
40
30
20
10
Kontrolle
61,64
70,77
106
124,127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 57

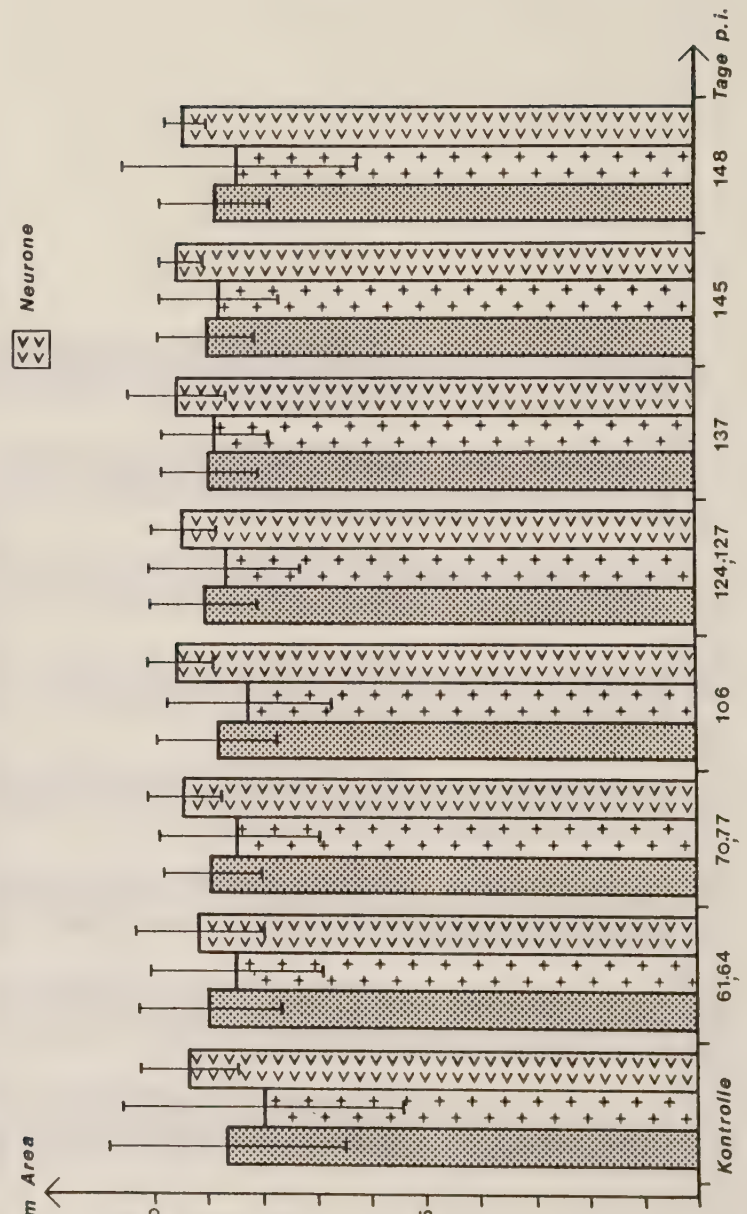
Mittlere Formfaktoren
bei Messung der Zellkerngröße
Gliazellen Gruppe 1
Gliazellen Gruppe 2
Neurone
Form Area
1.00
0.95
0.90
Kontrolle
61,64
70,77
106
124,127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 58

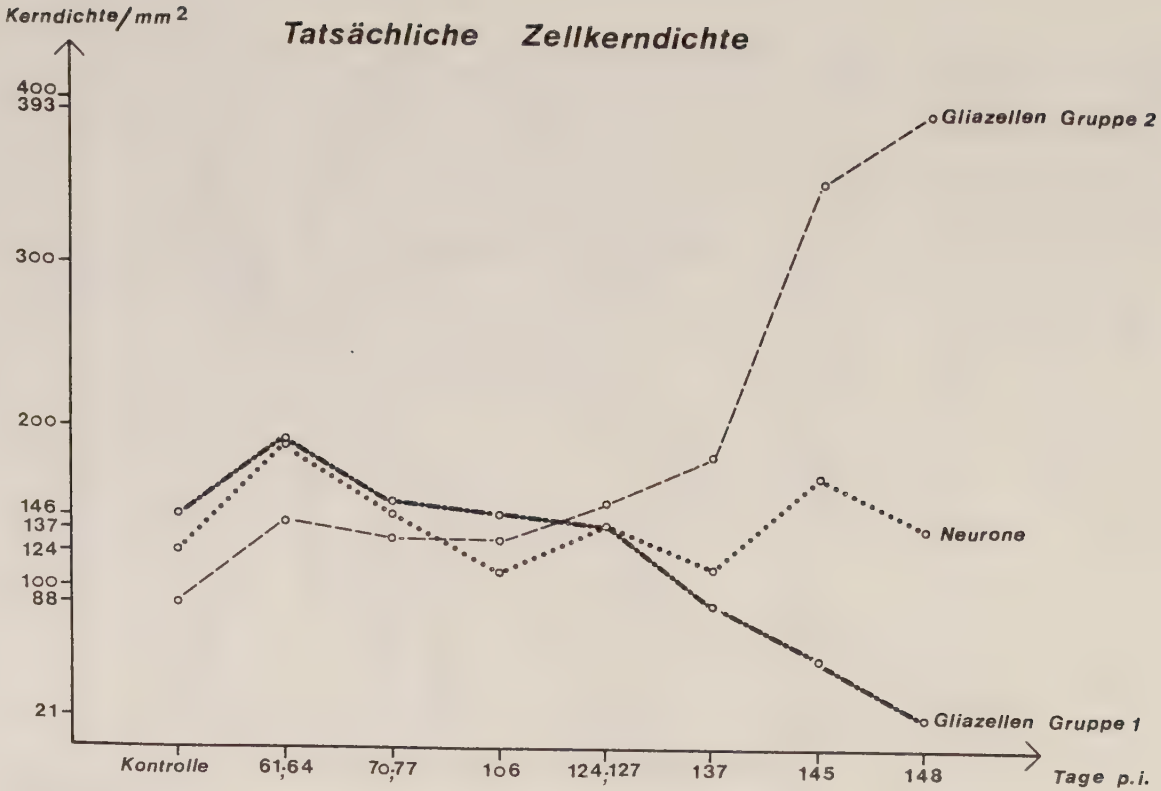
Kerndichte/mm 2
Tatsächliche Zellkerndichte
400
393
300
200
146
137
124
100
88
21
Gliazellen Gruppe 2
Neurone
Gliazellen Gruppe 1
Kontrolle
61;64
70;77
106
124;127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 59

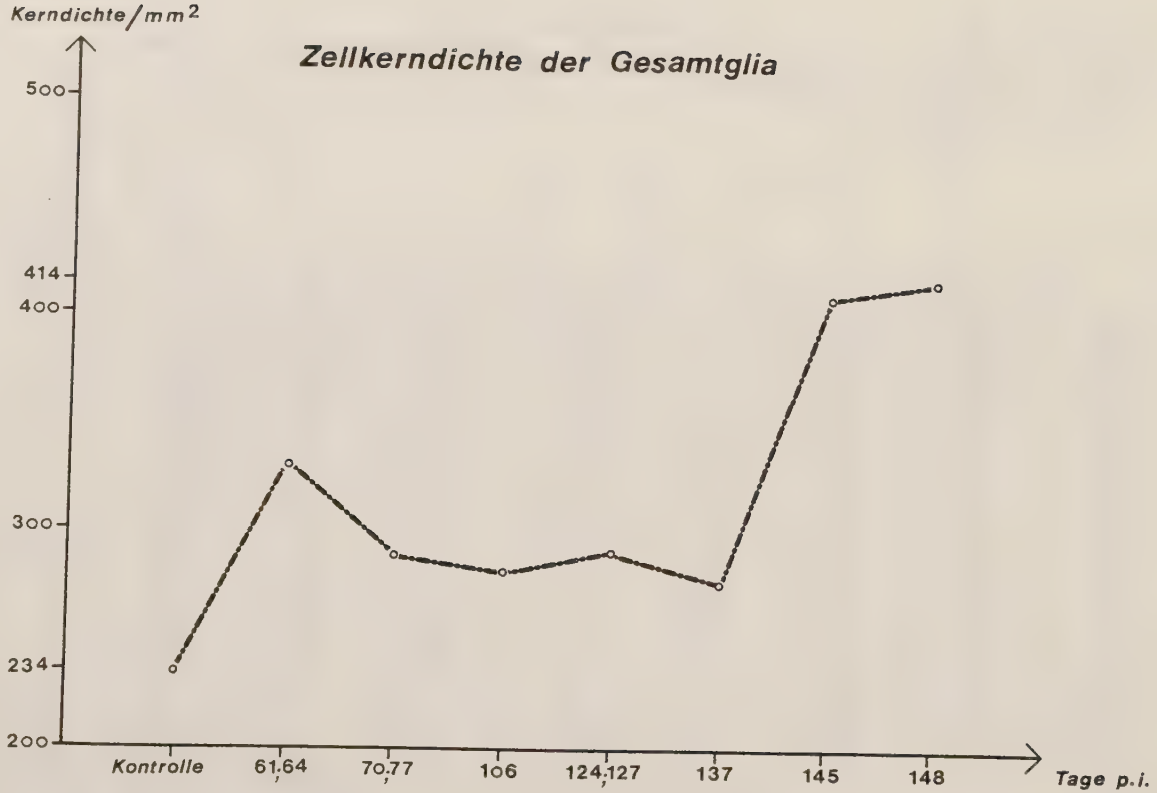
Kerndichte/mm²
Zellkerndichte der Gesamtglia
500
414
400
300
234
200
Kontrolle
61;64
70;77
106
124;127
137
145
148
Tage p.i.

Abb. 60

9. Literaturverzeichnis

ABERCROMBIE, M.:
Estimation of nuclear population from microtomic sections.
Anat. Rec. 94, 239-247 (1946)

ADAMS, D.H; FIELD, E.J.:
The infective process in scrapie.
Lancet II, 714 (1968)

ALPER, T.; HAIG, D.A.; CLARKE, M.C.:
The exceptionally small size of the scrapie agent.
Biochem. Biophys. Res. Commun 22, 278-284 (1966)

AOKI, T.; GIBBS, C.J., jr.; SOTELI, J.; GAJDUSEK, D.C.:
Heterogenic autoantibody against neurofilament protein in the sera of animals with experimental kuru and Creutzfeldt-Jakob disease and natural scrapie infection.
Infect. Immun. 38, 316-324 (1982)

ASHER, D.M.; YANAGIHARA, R.T.; ROGERS, N.G.; GIBBS, C.J. jun., GAJDUSEK, D.C.:
Studies of the viruses of spongiform encephalopathies in cell cultures.
in: Referat HUNTER, G.D., 235-249 (1979)

BARINGER, J.R.; PRUSINER, S.B.:
Experimental Scrapie in Mice: Ultrastructural Observations.
Ann. Neurol. 4, 205-211 (1978)

BARINGER, J.R.; WONG, J.; KLASSEN, T.; PRUSINER, S.B.:
Further Observations on the Neuropathology of Experimental Scrapie in Mouse and Hamster.
In: Slow Transmissible Diseases of the Nervous System Vol. 2: S.B. Prusiner, W.J. Hadlow (Eds.)
Academic Press New York, pp. 111-121 (1979)

BECK, E.; DANIEL, P.M.; PARRY, H.B.:
Degeneration of the Cerebellar and Hypothalamo-Neurohypophyseal Systems in Sheep with Scrapie and its Relationship to Human system degenerations.
Brain 87, 153-176 (1964)

BROTHERSTON, J.G.; RENWICK, C.DC.; STAMP, J.T.; ZLOTNIK, I.; PATTISON, I.H.:
Spread of scrapie by contact to goats and sheep.
J. comp. Pathol. 78. 9 (1968)

BRUCE, M.E.; FRASER, H.:
Amyloid Plaques in the Brains of Mice Infected with Scrapie:
Morphological Variation and Staining Properties.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1, 189 (1975)

BRUCE, M.E.; FRASER, H.:
Effect of Route of Infection on the Frequency and Distribution of Cerebral Amyloid Plaques in Scrapie Mice.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 7, 289 (1981)

BUYUKMIHCI, N.; GOEHRING-HARMON, F.; MARSH, R.F.:
Neural Pathogenesis of Experimental Scrapie after Intraocular Inoculation of Hamsters.
Exp. Neurol. 81, 396 (1983)

CARP, R.I.; CALLAHAN, S.M.; SERSEN, E.A.; MORETZ, R.C.:
Preclinical changes in weight of Scrapie-infected mice as a function of Scrapie agent-mouse strain combination.
Intervirology 21, 61-69 (1984)

CHANDLER, R.L.:
Encephalopathie in mice produced by inoculation with scrapie brain material.
Lancet, II 1378-1379 (1961)

CHANDLER, R.L.:
Experimental scrapie in the mouse.
Res. Vet. Sci. 4, 276-285 (1963)

CLARKE, M.C.; HAIG, D.A.:
Presence of the transmissible agent of scrapie in the serum of affected mice and rats.
Vet. Rec. 80, 504 (1967)

CLARKE, M.C.:
The antibody response of scrapie-affected mice to immunisation with sheep red blood cells.
Res. Vet. Sci. 9, 595-597 (1968)

CLARKE, M.C.; HAIG, D.A.:
Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture.
Nature 225, 100-101 (1970)

CLARKE, M.C.; HAIG, D.A.:
Multiplication of scrapie agent in mouse spleen.
Res.Vet.Sci. 12, 195-197 (1971)

CLARKE, M.C.:
Infection of cell cultures with scrapie agent. in:
Referat HUNTER, G.D., 225-233 (1979)

COMBER:
"Real Improvements in Agriculture" (1772).
zitiert von MC GOWAN, J.P. in:
Bull. Edin. and East of Scot. Coll. (1914)

CULLÉ, J.; CHELLE, P.L.:
La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?
Comptes rendus acad. des Sciences, p. 1552 (1936)

DICKINSON, A.G.; MEIKLE, V.M.H.; FRASER, H.:
Identification of a gene, which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice.
J. Comp. Pathol. 78, 283-299 (1968a)

DICKINSON, A.J.; STAMP, J.T.; RENWICK, C.C.; RENNIE, J.C.:
Some Factors controlling the incidence of scrapie in Cheriot sheep injected with a Cheriot-passaged scrapie agent.
J. Comp. Pathol. 78, 313-321 (1968b)

DICKINSON, A.G.; MEIKLE, V.M.H.:
A comparison of some biological characteristics of the mousepassaged scrapie agents 22A and ME7.
Genet. Res. 13, 213 (1969)

DICKINSON, A.G.; FRASER, H.; McCONNEL, I.; OUTRAM, G.W.:
Mitogenic stimulation of the host enhances susceptibility to scrapie.
Nature 272 54-55 (1978)

DICKINSON, A.G.; OUTRAM, G.W.:
The scrapie replication-site hypothesis and its implications of pathogenesis.
In: Slow transmissible diseases of the nervous System Vol. 2: S.B. Prusiner, W.J. Hadlow (Eds.) Academic Press New York, pp. 13-21 (1979)

DICKINSON, A.G.; BRUCE, M.E.; SCOTT, J.R.:
The relevance of Scrapie as an experimental model of Alzheimer's disease.
Banbury Report 15, 387-397 (1983)

DIENER, T.O.:
Is the scrapie agent a viroid?
Nature New Biology 235, 218 (1972)

DIRINGER, H.; HILMERT, H.; SIMON, D.; WERNER, E.; EHLERS, B.:
Towards Purification of the Scrapie Agent.
Eur. J. Biochem. 134, 555-560 (1983a)

DIRINGER, H.; GELDERBLOM, H.; HILMERT, H.; OEZEL, M.; EDELBLUTH, L.; KIMBERLIN, R.H.:
Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein.
Nature 306, 476-477 (1983b)

DIRINGER, H.; KIMBERLIN, R.H.:
Infectious Scrapie Agent is Apparently not as Small as Recent Claims Suggest.
Bioscience Reports 3, 563-568 (1983c)

DIRINGER, H.:
Sustained Viremia in Experimental Hamster Scrapie.
Brief Report
Eingereicht zur Publikation (1984)

DIRINGER, H.:
Persönliche Mitteilungen, 1984

DROZ, B.; LEBLOND, C.P.:
Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography.
J.Comp.Neurol. 121, 325-346 (1963)

EHLERS, B.; RUDOLPH, R.; DIRINGER, H.:
The Reticuloendothelial Systems in Scrapie Pathogenesis.
J.Gen.Virol. 65, 423-428 (1984)

EHLERS, B.:
Persönliche Mitteilungen, 1984

EKLUND, C.M.; KENNEDY, R.C.; HADLOW, W.J.:
Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse.
J. Infect. Dis. 117, 15-22 (1967)

FIELD, E.J.; RAINE, C.S.:
An Electron Microscopic Study of Scrapie in the Mouse.
Acta Neuropathol. 4, 200-211 (1964)

FIELD, E.J.; JOYCE, G.; KEITH, A.:
Failure of interferon to modify scrapie in the mouse.
J.Gen.Virol. 5, 149-150 (1969)

FRASER, H.; DICKINSON, A.G.:
Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen.
Nature 226, 462-463 (1970)

FRASER, H.; DICKINSON, A.G.:
Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus.
J.Comp.Pathol. 88, 1-11 (1978)

FRASER, H.:
Neuropathology of Scrapie: The Precision of the Lesions and Their Diversity.
In: Slow Transmissible Diseases of the Nervous System Vol. I
S.B. Prusiner, W.J. Hadlow (Eds.)
Academic Press New York pp. 387-406 (1979)

FRASER, H.:
The Pathogenesis and Pathology of Scrapie.
In: Aspects of slow and persistent virus infections. (Ed. D.A.J. Tyrrell)
Martinus Nijhoff, Hague, p. 30 (1979b)

GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.jun.; ALPERS, M.:
Experimental transmission of a kuru-like-syndrome to chimpanzees.
Nature, London 209 794-796 (1966)

GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J. jun.; ALPERS,M.:
Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees.
Science 155, 212-214 (1967)

GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J. jun.:
Slow, latent and temperate virus infections of the central nervous system.
in: Infections of the nervous system.
Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. 44, 254 (1968)

GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J. jun.:
Subacute and chronic diseases caused by atypical infections with unconventional viruses in aberrant hosts.
Perspect. Virol. VIII, 279 (1973)

GIBBONS, R.A.; HUNTER, G.D.:
Nature of the scrapie agent.
Nature (London) 215, 1041 (1967)

GIBBS, C.J. jun.; GAJDUSEK, D.C.; ASHER, D.M.; ALPERS, M.D.; BECK, E.; DANIEL, P.M.; MATTHEWS, W.B.:
Creutzfeldt-Jacob disease (spongiform encephalopathy) transmission to the chimpanzee.
Science 161, 388-389 (1968)

HADLOW, W.J.:
The Pathology of Experimental Scrapie in the Dairy Goat.
Res.vet.Sci. 2, 289 (1961)

HOGAN, R.H.; BARINGER, J.R.; PRUSINER, S.B.:
Progressive Retinal Degeneration in Scrapie-Infected Hamsters. A Light and Electron Microscopic Analysis.
Laboratory Investigation 44/1, 34-42 (1981)

HOLMAN, H.H.; PATTISON, I.H.:
Further Evidence on the Significance of Vacuolated Nerve Cells in the Medulla Oblongata of Sheep affected with Scrapie.
J.Comp.Pathol. 53, 231-236 (1943)

HUNTER, G.D.:
The enigma of the scrapie agent: Biochemical approaches and the involvement of membranes and nucleic acids. In: Slow transmissible diseases of the nervous system. S.B. Prusiner, W.J. Hadlow (eds.) Acad. Press New York Vol. 2 p.365-385 (1979)

IWASAKI, Y.; KOPROWSKI, H.; MÜLLER, D.; MEULEN, V. ter.:
Morphogenesis and structure of a virus in cells cultured from brain tissue from 2 cases of multiple sclerosis.
Laboratory Investigation 28., 494 (1973)

KASPER, G.C.; BOWMAN, K.; STITES, D.P.; PRUSINER, S.B.:
Towards development of assays for scrapie-specific antibodies.
Adv.Exp.Med.Biol. 134, 401-413 (1981)

KIMBERLIN, R.H.; MILLSON, G.L.; HUNTER, G.D.:
An experimental examination of the scrapie-agent in cell membrane mixtures. II. Studies of the operational size.
J.Comp.Pathol. 81 383-391 (1971)

KIMBERLIN, R.H.; CUNNINGHAM, P.G.:
Reduction of scrapie-incubation time in mice and hamsters by a single infection of methanol extraction residue of BCG.
FEBS lett. 3, 169-172 (1972)

KIMBERLIN, R.H.; WALKER, C.A.; MILLSON, G.L.:
Interspecies transmission of scrapie-like diseases.
Lancet 11: 1309-1310 (1975)

KIMBERLIN, R.H.:
Experimental scrapie in the mouse.
Sci.Prog.Oxf. 63, 461-481 (1976)

KIMBERLIN, R.H.; WALKER, C.A.:
Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose response curves.
J.Comp.Pathol. 88, 39-47 (1978)

KIMBERLIN, R.H.; WALKER, C.A.:
Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent multiplication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes.
J.Comp.Pathol. 89, 551-562 (1979)

KIMBERLIN, R.H.; WALKER, C.A.:
Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection.
J.R.Soc.Med. 75, 618-624 (1982)

KIMBERLIN, R.H.; WALKER, C.A.:
Invasion of the CNS by Scrapie Agent and its Spread to Different Parts of the Brain.
In: Virus non conventionels et effections du systeme nerveux central. L.Court (ed.)
Masson, Paris, pp.17-33 (1983)

LAMPERT, P.W.; HOOKS, J.; GIBBS, C.J., Jr.; GAJDUSEK, D.C.:
Altered Plasma Membranes in Experimental Scrapie.
Acta Neuropathol. (Berlin) 19. 81-93 (1971)

LAMPERT, P.W.; GAJOUSEK, D.C.; GIBBS, C.J. jun.:
Subacute spongiform virus encephalopathies.
American Journal of Pathology Vol. 68 3, 626-651 (1972)

LATARJET, R.:
Inactivation of the agents of scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease and kuru by gradiations.
In: Slow transmissible diseases of the nervous system.
S.B. Prusiner, W.J. Hadlow (eds.), Acad. Press New York Vol. 2: 387-407 (1979)

MARSH, R.F.; DEES, C.; CASTLE, B.E.; WADE, W.F.; GERMAN, T.C.:
Purification of the scrapie agent by density gradient centrifugation.
J. gen. Vivol. 65 415-421 (1984)

MCFARLIN, D.E.; RAFF, K.C.; SIMPEON, E.; NEHLSEN, S.H.:
Scrapie in Immunologically Deficient Mice.
Nature 233, 336 (1971)

MERZ, P.A.; SOMERVILLE, R.A.; WISNIEWSKI, H.M.; IQBAL, K.:
Abnormal Fibrils from Scrapie-Infected Brain.
Acta Neuropathol. (Berlin) 54, 63-74 (1981)

MERZ, P.A.; SOMERVILLE, R.A.; WISNIEWSKI, H.M.; MANUELIDIS, L.; MANUELIDIS, E.E.:
Scrapie-associated Fibrils in Creutzfeldt-Jakob Disease.
Nature 306, 474-476 (1983)

MEULEN, V. ter; KOPROWSKI, H.; IWASAKI, Y.; KÄCKELL, Y.; MÜLLER, D.:
Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells: Presence of nucleocapsids and virions and isolation of parainfluenza type virus.
Lancet 7766, 1 (1972)

MEULEN, V., ter:
Slow-Virus Infektionen des zentralen Nervensystems: Das Konzept eines langsamen Zelltodes.
Immunität u. Infektion 3, 211-218 (1975)

MILLSON, G.C.; KIMBERLIN, R.H.; MANNING, E.J.; COLLIS, S.C.:
Early distribution of radioactive liposomes and scarpie-infectivity in mouse-tissues following administration by different routes.
Vet. Microbiol. 4, 89-99 (1979)

MUSETEANU, C.; DIRINGER, H.:
Perivascular Infiltrates of Leucocytes in Brains of Scrapie-Infected Mice.
Nature 294, 360-361 (1981)

OUTRAM, G.W.; DICKINSON, A.G.; FRASER, H.:
Reduced susceptibility of scrapie in mice after steroid administration.
Nature 249, 855-856 (1974)

PALMER, A.C.:
Studies in scrapie.
The Veterinary Record, 1318-1324 (1957)

PATTISON, I.H.; SMITH, K.:
Histological observations on experimental scrapie in the mouse.
Res.Vet.Sci. 4, 269-275 (1963)

PATTISON, I.H.:
Experiments with scrapie with Special Reference to the Nature of the Agent and the Pathology of the Disease.
NINDB Monograph No.2
Slow, Latent and Temperature Virus Infections. pp. 249-257 (1965)

PATTISON, I.H.; JONES, K.M.:
The astrocytic reaction in experimental scrapie in the rat.
Res.Vet.Sci. 8, 160-165 (1967)

PRINEAS, J.:
Paramyxovirus-like particles associated with acute demyelination in chronic relapsing multiple sclerosis.
Science 178, 760 (1972)

PRUSINER, S.B.; GROTH, D.F.; MASIARZ, F.R.; MCKINLEY, M.P.; COCHRAN, S.P.; MARTINEZ, H.M.:
Molecular properties, partial purification and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent.
Biochemistry 19, 4883-4891 (1980)

PRUSINER, S.B.; MCKINLEY, M.P.; GROTH, D.F.; BOWMAN, K.A.; MOCK, N.I.; COCHRAN, S.P.; MASIARZ, F.R.:
Scrapie agent contains a hydrophobic protein.
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 78 6675-6679 (1981)

PRUSINER, S.B.:
Novel proteinacious infections particles cause scrapie.
Science 216, 136-144 (1982a)

PRUSINER, S.B.; BOLTON, D.C.; GROTH, D.F.; BOWMAN, K.A.; COCHRAN, P.S.; MCKINLEY, M.P.:
Further purification and characterisation of scrapie-prions.
Biochemistry 21, 6942-6950 (1982b)

SIGURDSSON, B.:
Rida, a chronic encephalitis of sheep.
Br.Vet.J. 110, 341-354 (1954)

STAMP, J.T.:
Scrapie, a transmissible disease of sheep.
Vet.Rec. 74, 357-362 (1962)

STAMP, J.T.:
Scrapie and slow viruses.
In: Animal Disease Research Association, Moredun Institute, Edinburgh.
Ann. Rep. 31 (1968)

TAYLOR, A.C.; WEISS, P.C.:
Demonstration of axonal flow by the movement of Tritium-labeled protein in mature optic nerve fibres.
Proc.Natl.Acad.Sci. 54, 1521-1527 (1965)

TERRY, R.D.:
Cortical Morphometry in Alzheimer's Disease.
In: Biological aspects of Alzheimer's Disease.
Banbury Report Vol.15
R. Katzman (ed.) (1983)

UTERMOHLEN, V.; ZABRISKI, J.B.:
Suppressed cellular immunity to measles antigen in multiple-sclerosis patients.
Lancet II, 1147 (1973)

WEISS, P.; HISCOE, H.B.:
Experiments on the mechanisms of nerve growth.
J.exp.Zool. 107, 315-395 (1948)

WILSON, P.R.; ANDERSON, R.D.; SMITH, W.:
Studies in scrapie.
J.Comp.Pathol. 60. 267-282 (1950)

WISNIEWSKI, H.M.; BRUCE, M.E.; FRASER, H.:
Infectious Etiology of Neuritic (Senile) Plaques in Mice.
Science 190, 1108-1110 (1975)

WORTHINGTON, M.; CLARKE, R.:
Lack of effect of immunosuppression on scrapie infection in mice.
J.Gen.Virol. 13, 349-351 (1971)

WORTHINGTON, M.:
Interferon system in mice infected with the scrapie agent.
Infect. Immun. 6, 643-645 (1972)

ZLOTNIK, I.; RENNIE, J.C.:
The Occurence of Vacuolated Neurons and vascular Lesions in the Medullas of Apparently Healthy Sheep.
J.Comp.Pathol. 67, 30 (1957)

ZLOTNIK, I.; RENNIE, J.C.:
Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters.
J.Comp.Pathol. 75, 147-157 (1965)

Herrn Professor Dr. Hans-Dieter Gatżke danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Roman Kaatz, der im Sommer 1984 verstarb, schulde ich Dank für die wertvolle Hilfestellung und Betreuung bei den experimentellen Arbeiten.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Rita Dübel für die Herstellung der histologischen Schnittpräparate und Frau Gisela Lange für die Reproduktion der lichtmikroskopischen Bilder.

Lebenslauf

Name:	Gregor, Alexander Pleger
Geboren:	19. Oktober 1956
Geburtsort:	Berlin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Hans Pleger, Lehrer Eva-Maria Pleger, Hausfrau
Familienstand:	verheiratet mit der Zahnärztin Dr. Brisca Engel-Pleger, ein Kind
Schulbildung:	1963 Einschulung in die St. Franziskus-Schule in Berlin-Schöneberg 1967 Übergang an das Canisius-Kolleg-Gymnasium in Berlin Tiergarten 1975 Abitur
Studium:	Beginn im Sommersemster 1976 an der FU-Berlin Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 10.03.1977 Zahnärztliche Vorprüfung am 10.10.1978 Zahnärztliche Prüfung am 31.08. 1981
Berufstätigkeit:	vom 1.10.1981 bis 30.09.1984 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für zahnärztliche Prothetik der FU-Berlin, seit 1.10.1984 als niedergelassener Zahnarzt in Berlin-Lichterfelde tätig.

gez. Gregor Pleger